

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Cambios con el envejecimiento en la función y estado redox de  
leucocitos peritoneales de ratones sometidos a un shock endotóxico:  
efectos de intervenciones horméticas y nutricionales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Oskarina Hernández Bolívar**

Directora  
Mónica de la Fuente del Rey

**Madrid, 2016**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas



*Cambios con el envejecimiento en la función y estado redox de leucocitos peritoneales de ratones sometidos a un shock endotóxico. Efectos de intervenciones horméticas y nutricionales.*

Memoria presentada por Oskarina Hernández Bolívar para obtener el Grado de Doctor.

Madrid, 2015.



**Mónica De la Fuente Del Rey**, Catedrática de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “***Cambios con el envejecimiento en la función y estado redox de leucocitos peritoneales de ratones sometidos a un shock endotóxico. Efectos de intervenciones horméticas y nutricionales.***”, realizada por **Oskarina Hernández Bolívar**, bajo mi dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 3 de Noviembre de 2015

**VºBº de la Directora de Tesis**

**Dra. Mónica De la Fuente Del Rey**

**Oskarina Hernández Bolívar**



La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los siguientes proyectos: Fundación Médica Mutua Madrileña “Mecanismos inmunológicos implicados en la mayor susceptibilidad a infecciones con el envejecimiento. Acción de los antioxidantes” 2007-2010; BFU2008-04336 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), BFU2011-30336 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Grupo UCM: Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición (ENEROINN) Nº 910379 y RED Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS 2012) de Fragilidad y Envejecimiento del Instituto de Salud Carlos III y FEDER (Unión Europea) RETICEF (RD12/0043/0018).

Bajo la concesión a Oskarina Hernández Bolívar de una beca internacional de formación de estudios de tercer grado por la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho del Ministerio de Ciencia y Tecnología con el número E-225-98-2006-1.

*A mis ratones ICR-CD1.*



*“Nuestros arsenales para destruir bacterias son tan poderosos... que corremos más  
peligro a causa de ellos que de los invasores”*

Thomas Lewis

## **Abreviaturas**

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa (del inglés, <i>adrenocorticotropic hormone</i> ).
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1.
<b>APC</b>	Células presentadoras de antígenos.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato.
<b>BCA</b>	Ácido bicinónico.
<b>BCR</b>	Receptor de las células B.
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica.
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino.
<b>Ca</b>	Calcio.
<b>CARS</b>	Síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensatoria.
<b>CAT</b>	Catalasa.
<b>CCL</b>	Ligando de quimioquina con motivos C-C.
<b>CCR</b>	Receptor de quimioquinas CC.
<b>CD</b>	Complejo de diferenciación (del inglés, <i>Cluster of Differentiation</i> ).
<b>ConA</b>	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> ).
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2.
<b>Cpm</b>	Cuentas por minuto.
<b>CRF</b>	Factor liberador de corticotropina.
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina (del inglés, <i>Corticotropin-Releasing Hormone</i> ).
<b>Cu</b>	Cobre.
<b>CXCL</b>	Ligando de quimioquina con motivos C-X-C.
<b>DC</b>	Célula dendrítica.

<b>DHEA</b>	Dehidroepiandrosterona.
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.
<b>EF</b>	Eficacia de fagocitosis.
<b>ERK</b>	Quinasas reguladas por señalización extracelular (del inglés, <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> ).
<b>Fc</b>	Fragmento cristizable de las inmunoglobulinas
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína.
<b>fMLP</b>	N-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (f-Met-Leu-Phe).
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico.
<b>GC</b>	Glucocorticoides.
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento.
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> ).
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa.
<b>GR</b>	Glutación reductasa.
<b>GSH</b>	Glutación reducido.
<b>GSSG</b>	Glutación disulfuro o glutación oxidado.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno.
<b>HHA</b>	(eje) Hipotálamo-hipófisis-adrenal.
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano.
<b>HSP</b>	Heat shock protein (proteína de choque térmico).
<b>HT</b>	Hormonas tiroideas.
<b>IF</b>	Índice de fagocitosis.
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma.
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina.
<b>IL</b>	Interleuquina.
<b>IQ</b>	Índice de quimiotaxis.
<b>Jak-STAT</b>	Vía de señalización Jak-STAT (del inglés, <i>Janus kinase (JAK) y Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)</i> ).
<b>KC</b>	Quimioquina derivada de queratinocitos.

<b>LBP</b>	Proteína de unión a lipopolisacárido.
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad (del inglés, <i>Low-Density Lipoprotein</i> ).
<b>LFA-1</b>	Antígeno asociado a la función de linfocitos (del inglés, <i>Lymphocyte Function associated Antigen-1</i> ).
<b>LH</b>	Hormona luteinizante.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido (de la membrana de <i>E. coli</i> ).
<b>LT</b>	Leucotrieno.
<b>Mac-1</b>	Antígeno de macrófago-1 (del inglés, <i>Macrophage-1 antigen</i> ).
<b>MAPK</b>	Quinasas activadas a través de mitógeno (del inglés, <i>Mitogen activated protein kinases</i> , MAP kinasa).
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (=CCL2).
<b>MEL</b>	Melatonina.
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>Major histocompatibility complex</i> ).
<b>MIF</b>	Factor de inhibición migratoria de macrófagos (del inglés, <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> ).
<b>MIP</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos.
<b>MOD</b>	Síndrome de disfunción multiorgánica.
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína.
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida.
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B.
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso.
<b>NK</b>	Asesinas naturales (del inglés, <i>Natural Killer</i> ).
<b>NK</b>	Natural killer.
<b>NO</b>	Óxido nítrico.
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido.
<b>OH.</b>	Radical hidróxilo.
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares ligados a patógenos.
<b>PBS</b>	Solución tamponada de fosfatos.
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva.

<b>PE</b>	Ficoeritrina.
<b>PG</b>	Prostaglandina.
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa.
<b>PKC1</b>	Proteína quinasa C 1.
<b>PMN</b>	Polimorfonuclear.
<b>RANTES</b> activación.	Expresado y secretado por células T normales, y regulado por
<b>RL</b>	Radicales libres.
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno.
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>SIRS</b>	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
<b>SNA</b>	Sistema nervioso autónomo.
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central.
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático
<b>sTNF-RI/-RII</b>	Receptor soluble I o II de TNF.
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético.
<b>TCR</b>	Receptor antígeno-específico de las células T.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ (del inglés, <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> ).
<b>Th</b>	Linfocito T helper o cooperador.
<b>TLR</b>	Receptor de tipo Toll (del inglés, <i>Toll-like receptor</i> ).
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TP</b>	Tioprolina.
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular.
<b>XO</b>	Xantina oxidasa.



## Índice

Resumen.....	18
Abstract .....	28
1. Introducción.....	38
1.1. El envejecimiento.....	38
1.1.1. Definición del envejecimiento.....	38
1.1.2. Conceptos de longevidad media y máxima.....	40
1.1.3. La edad biológica.....	41
1.1.4. Teorías del envejecimiento.....	42
1.2. El sistema inmunitario y la inmunosenescencia.....	49
1.2.1. El sistema inmunitario.....	49
1.2.2. La inmunosenescencia.....	49
1.3. La comunicación neuroinmunoendocrina y sus cambios con el envejecimiento....	60
1.3.1. La comunicación neuroinmunoendocrina.....	60
1.3.2. Cambios en la comunicación neuroinmunoendocrina con el envejecimiento.....	64
1.4. El estrés oxidativo y el sistema inmunitario. Papel del envejecimiento.....	68
1.4.1. El estrés oxidativo.....	68
1.4.2. El sistema inmunitario y el estrés oxidativo.....	82
1.4.3. Estrés oxidativo y el sistema inmunitario en el envejecimiento.....	85
1.5. Shock endotóxico.....	89
1.5.1. Endotóxina.....	96
1.5.2. Fisiopatología del shock endotóxico.....	103
1.5.3 Shock endotóxico y el sistema inmunitario.....	107
1.5.4 Shock endotóxico y el sistema nervioso y endocrino.....	121
1.5.5. Shock endotóxico y envejecimiento.....	127
1.5.6. Los antioxidantes en el shock endotóxico.....	129
1.6 El proceso de hormesis.....	133
1.6.1 Concepto de hormesis.....	133
1.6.2 Las hormetinas y sus efectos.....	134
1.6.3 La hormesis y el shock endotóxico.....	143
2. Justificación y objetivos.....	146

3. Materiales y Métodos.....	153
3.1. Material biológico.....	153
3.1.1. Animales.....	153
3.1.2. Línea celular.....	154
3.2. Soluciones salinas y medios de cultivos .....	154
3.3. Reactivos.....	155
3.4. Aparatos y material de laboratorio.....	158
3.5. Diseños Experimentales y métodos.....	161
3.5.1. Estudio de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras adultas, maduras, viejas y longevas, así como de la supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de <i>E. coli</i> .....	161
3.5.2. Estudiar las diferencias en las repuestas funcionales y estado redox de las células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras de edad madura, tras la administración de 50 mg/kg de LPS, en animales que sobrevivieron y no al shock endotóxico.....	163
3.5.3. Estudiar el efecto de una estrategia de <i>Hormesis</i> basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones ICR-CD1 hembras, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro. Esto se analizará tanto en animales controles como sometidas a un shock endotóxico letal, por LPS de <i>E. coli</i> , en la vejez.....	163
3.5.4. Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico.....	166
3.5.5. Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Así mismo, estudiar la supervivencia de estos ratones, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.....	168
3.6. Métodos.....	169
3.6.1. Pruebas conductuales .....	169
3.6.1.1. Pruebas para valorar la capacidad sensoriomotora.....	170
3.6.1.2. Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad.....	174

3.6.2. Modelo de envejecimiento prematuro.....	182
3.6.3. Obtención de la suspensión peritoneal. Recuento y viabilidad celular.....	183
3.6.4. Valoración de los parámetros de función inmunitaria.....	184
3.6.4.1. Estudio de la funcionalidad de los macrófagos .....	184
3.6.4.2. Estudio de la funcionalidad de los linfocitos.....	188
3.6.4.3. Actividad citotóxica “natural killer” NK.....	190
3.6.5. Valoración de los parámetros de estrés oxidativo.....	193
3.6.5.1 Valoración de defensas antioxidantes.....	193
3.6.5.2 Valoración de agentes oxidantes.....	197
3.6.6. Estudio de la expresión en membrana de marcadores celulares.....	198
3.6.7 Análisis Estadístico.....	200
<b>4. Resultados.....</b>	<b>202</b>
4.1. Estudio de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras adultas, maduras, viejas y longevas, así como su supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de <i>E. coli</i> .....	202
4.2. Comparación de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 de edad madura, que sobrevivieron o murieron tras la administración de 50 mg/kg de LPS.....	235
4.3. El efecto de una estrategia de <i>Hormesis</i> basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones ICR-CD1 hembras, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro. Esto se analizará tanto en animales controles como sometidas a un shock endotóxico letal, por LPS de <i>E. coli</i> , en la vejez.....	248
4.3.A. Efecto del tratamiento hormético en ratonas cronológicamente maduras.....	249
4.3.1. Efecto de la hormesis sobre la conducta.....	249
4.3.2. Estudio de las funciones inmunitarias.....	256
4.3.3. Defensas antioxidantes y compuestos oxidantes.....	261

4.3.B. Efecto del tratamiento hormético en ratonas maduras con envejecimiento prematuro.....	263
4.3.4. Función inmunitaria y estrés oxidativo de ratonas maduras PAM y NPAM con hormesis.....	264
4.3.5. Parámetros de conducta, función inmunitaria y estrés oxidativo de ratonas viejas NPAM y PAM con hormesis, tras ser sometidas a un shock endotóxico.....	265
4.4. Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico.....	288
4.4.1. Peso corporal e ingesta de las dietas .....	289
4.4.2. Estudio de la función inmunitaria .....	292
4.4.3. Estudio del estrés oxidativo.....	308
4.4.4. Supervivencia.....	318
4.5. Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Estudio de la supervivencia de ratones C57BL6/129, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales. ....	320
4.5.1. Supervivencia de ratones C57BL6/129, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.....	332
5. Discusión.....	335
5.1. Cambios en parámetros de función y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras adultas, maduras, viejas y longevas, así como de la supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de <i>E. coli</i> . ....	336
5.2. Estudiar las diferencias en las repuestas funcionales y estado redox de las células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras de edad madura, tras la administración de 50 mg/kg de LPS, en animales que sobrevivieron y no al shock endotóxico.....	360

5.3. Estudiar el efecto de una estrategia de <i>Hormesis</i> basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones ICR-CD1 hembras, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro.....	367
5.4. Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico.....	390
5.5. Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Así mismo, estudiar la supervivencia de estos ratones, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.....	398
6. Conclusiones.....	409
7. Referencias bibliográficas.....	414
8. Anexos.....	465

## ***Resumen***

---

***Cambios con el envejecimiento en la función y estado redox de leucocitos peritoneales de ratones sometidos a un shock endotóxico. Efectos de intervenciones horméticas y nutricionales.***

El shock endotóxico constituye, debido a su elevada tasa de mortalidad, uno de los retos más importantes para la medicina actual, especialmente la ejercida en las unidades de cuidados intensivos. Aunque muchas infecciones pueden cursar con shock séptico son los bacilos Gram-negativos los principales responsables de esta situación clínica al ser capaces de liberar ciertos lipopolisacáridos (LPS) de su membrana celular, los cuales adquieren características de endotoxinas. Su instauración y progresión involucra varios procesos integrados y antagónicos, que implican una respuesta inflamatoria exacerbada que viene acompañada por una respuesta de supresión inmunitaria que busca contrarrestar la respuesta inicial, y que son definidas como fase hiperdinámica e hipodinámica, respectivamente. Se asume que es esa respuesta inmunitaria a la infección, en la que se liberan una gran cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios para defenderse de los patógenos, la que, si no está bien regulada, causa el fallo multiorgánico que lleva a la muerte del individuo. Al avanzar la edad aumenta la susceptibilidad a padecer infecciones, y parece ser menor la cantidad de agente infeccioso que se requiere para desencadenar un shock séptico letal. Este hecho podría relacionarse con los cambios que al envejecer experimenta el sistema inmunitario, la denominada inmunosenescencia, en la que tiene lugar un mayor y mal regulado estrés oxidativo e inflamatorio. Dado que este sistema fisiológico es esencial para el mantenimiento de una adecuada salud y que se ha comprobado interviene en la velocidad de envejecimiento de cada individuo, esto es, la denominada edad biológica, el

conocer los cambios de las células inmunitarias al avanzar la edad y cómo responden frente a un proceso infeccioso, resulta esencial para entender la mayor susceptibilidad a infecciones de la vejez. Por otra parte, dado que los individuos longevos, tanto ratones que alcanzan una elevada esperanza de vida como los humanos centenarios, muestran en una serie de parámetros de sus células inmunitarias unos valores similares a los de los adultos sanos, lo que acredita al sistema inmunitario como un excelente marcador de edad biológica y longevidad, el analizar en ratones longevos su respuesta inmunitaria frente a la infección parece necesario. Si, como se ha indicado, el estado inmunitario es indicador de la velocidad de envejecimiento de cada individuo, de su edad biológica, a una misma edad cronológica puede haber sujetos que realmente tengan una edad biológica más joven y en los que la respuesta inmunitaria a la infección resulte diferente, repercutiendo esto en la supervivencia de los mismos. Los parámetros inmunitarios más relacionados con esta mejor defensa frente al shock endotóxico se desconocen. De las estrategias de estilo de vida establecidas para mejorar el sistema inmunitario, la ingestión de dietas con cantidades apropiadas de antioxidantes es una de las que ha resultado ser más efectiva, especialmente al envejecer, consiguiendo devolver los valores de parámetros inmunitarios deteriorados en la vejez a los que presentan los adultos. Teniendo en cuenta la efectividad que en este sentido ha demostrado tener la administración conjunta de dos antioxidantes tiólicos como la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP) en la dieta, y antes los resultados previos sobre la buena inmunomodulación que ejerce la inyección i.p. de NAC en ratones jóvenes con shock endotóxico letal, la cual es seguida por un aumento de su supervivencia, se ha querido comprobar si realmente esa dieta podría mejorar la respuesta inmunitaria a la infección y si este



hecho depende de la edad. Por otro lado, las estrategias horméticas, se están teniendo cada vez más en cuenta en el contexto de hacer más lento el proceso de envejecimiento. Un tratamiento con hormesis, utilizando como hormétina la administración de bajas dosis de LPS durante la edad adulta, podría permitir un rejuvenecimiento de la funcionalidad y estado redox de las células inmunitarias y mejorar su capacidad de respuesta a un shock endotóxico letal en la vejez, tanto en ratones cronológicamente viejos como los que están prematuramente envejecidos (*Prematurely aging mice: PAM*).

En base a lo indicado, se ha planteado la siguiente **hipótesis**: los cambios en las funciones y estado redox de las células inmunitarias de ratones frente a la administración de una cantidad de endotoxina, y la supervivencia del animal, variarán según la edad cronológica y biológica del individuo. Las estrategias de hormesis y nutricionales (con antioxidantes administrados en la dieta) mejorarán tales funciones y supervivencia. Se darán variaciones dependiendo de la cepa y sexo utilizados.

Para dar respuesta a la hipótesis indicada, se han planteado los siguientes objetivos:

**Primer objetivo:** Estudio de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, así como su supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*.

**Segundo objetivo:** Comparación de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 de

edad madura, que sobrevivieron o murieron tras la administración de 50 mg/kg de LPS.

**Tercer objetivo:** Estudio del efecto de una estrategia de Hormesis basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones hembras ICR-CD1, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro, y tanto en animales sometidos a un shock endotóxico letal, por LPS de *E. coli*, en la vejez, como en los correspondientes controles.

**Cuarto objetivo:** Estudio del efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico por administración de LPS de *E.coli*.

**Quinto objetivo:** Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Estudio de la supervivencia de ratones C57BL6/129, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.

Los **resultados** correspondientes al primer objetivo mostraron que con la edad aparece un deterioro funcional y de estado redox de las células inmunitarias peritoneales, que no fue observado en los animales longevos, los cuales mantienen, en general, unos valores similares a los adultos. Los ratones adultos y longevos

tienen una mejor respuesta tras la inyección de la endotoxina (50 mg/kg de LPS), con una mayor estimulación de la quimiotaxis, fagocitosis, digestión (anión superóxido intracelular), proliferación linfocitaria y actividad NK, así como también de la actividad antioxidante catalasa (CAT) y de los niveles de glutatión (GSH); cambios que no fueron apreciados en las otras edades. Estos hechos se corresponden con la supervivencia de los animales frente a esa dosis de LPS, produciéndose en todas las edades, con excepción de las adultas, un shock endotóxico letal. En la edad adulta esa dosis de LPS produjo un shock endotóxico reversible, siendo necesarios 100 mg/kg de LPS para provocar uno de tipo letal, en el cual los cambios funcionales y de estado redox no fueron similares a los observados con 50 mg/kg. Tampoco la dosis de 25 mg/kg de LPS en los ratones viejos produjo cambios funcionales y redox similares a la de 50 mg/kg, aunque las dos fueron letales.

Con respecto al segundo objetivo, los resultados demostraron que las ratonas maduras que recibieron 50 mg/kg de LPS, la mayoría (el 80% del total) murió a las 62 h de la administración, pero las que sobrevivieron (el 20%) mostraban en sus células inmunitarias peritoneales, antes de serles administrada la endotoxina, una mejor digestión, capacidad linfoproliferativa en respuesta a LPS y especialmente de la actividad de CAT, que los animales no supervivientes. Tras recibir el LPS, los supervivientes conservaron la mejor capacidad digestiva, presentaron una mayor respuesta linfoproliferativa, actividad NK y niveles de GSH, durante las primeras horas de instauración del shock, y no presentando disminución de la actividad CAT, condiciones indicativas de una mejor respuesta ante la endotoxemia que los animales no supervivientes.

En cuanto al tercer objetivo, el tratamiento hormético llevado a cabo con la administración de LPS como hormetina (0,1 mg/Kg de LPS) en ratonas maduras, durante cuatro sesiones, con intervalos de 15 días, provocó una mejora de su respuesta conductual en la vejez tanto en la capacidad sensoriomotora, como exploratoria, asemejándolas a las que presentan los animales controles adultos y, por tanto mejor que la que muestran los correspondientes animales viejos. Esta estrategia hormética también mejoró parámetros funcionales y de estrés oxidativo de las células inmunitarias en la vejez, obteniéndose valores semejantes a los de las células de animales controles adultos. La utilización de esa misma hormetina resultó eficaz para mejorar la coordinación motora y exploratoria de los PAM en la vejez, así como sus parámetros funcionales (quimiotaxis, fagocitosis, digestión, linfoproliferación y actividad NK) y de estado redox (aumento de la actividad CAT y de los niveles de GSH y disminución del anión superóxido extracelular y de xantín oxidasa: XO). Tras la administración de 50 mg/kg de LPS la respuesta funcional y de estado redox mejoró en los animales con hormesis frente a sus controles. Esto se reflejó en una mayor supervivencia.

Los resultados del cuarto objetivo indican que la suplementación de la dieta con antioxidantes tiólicos (0,1% p/p NAC y TP) durante cuatro semanas, en animales adultos, viejos y longevos, mejora las funciones (fagocitosis, digestión, linfoproliferación en respuesta a mitógenos) y estado redox (mayor actividad CAT y niveles de GSH, y menores de  $O_2^{\cdot-}$  extracelular y XO) de los leucocitos peritoneales, en mayor grado en la vejez. La administración de un shock endotóxico con 50 mg/kg de LPS, produjo una mejor respuesta funcional y redox en las células de los animales que ingirieron la dieta con antioxidantes en

comparación con los controles. Todo ello repercutió en una mayor supervivencia de estos animales.

En relación al quinto objetivo los ratones viejos de la cepa C57BL6/129 hembras, muestran una mejor condición basal de sus leucocitos peritoneales, para parámetros como la quimiotaxis de linfocitos, fagocitosis, digestión y actividad XO, en comparación con los machos. Tras la inyección de la endotoxina (50 mg/kg de LPS), las hembras mostraron una mejor respuesta funcional y de estado redox (en quimiotaxis, fagocitosis, digestión, actividad NK y niveles de GSH), presentando también, una mayor supervivencia. Las hembras de esta cepa, en la vejez, manifestaron algunas diferencias, en las respuestas funcionales y redox de sus células peritoneales, en comparación con las de las hembras de la cepa ICR/CD1 de la misma edad. Los % de mortalidad en machos fueron, en general, mayores que los de hembras, a diferentes edades y dosis de LPS.

Como **conclusiones** se podrían indicar las siguientes:

1. En ratones hembras ICR/CD1 al avanzar la edad se aprecia un deterioro funcional y de estado redox en las células inmunitarias peritoneales, hecho que no sucede en los animales longevos, los cuales, en general, mantienen valores similares a los adultos. Este estado basal va a condicionar los cambios funcionales y de estrés oxidativo tras la administración intraperitoneal de 50 mg/Kg de endotoxina (LPS). En general, en adultas y longevas se da una estimulación de muchas de las funciones y de defensas antioxidantes estudiadas, lo que no es igualmente apreciable en las otras edades. Esas respuestas funcionales y redox son diferentes en adultas y viejas tras la administración de un shock endotóxico letal por inyección de

- 100 g/kg y 25 mg/kg de LPS, respectivamente. La administración de 50 mg/kg de LPS, que produce un shock endotóxico letal en todas las edades, con excepción de los ratones adultos, es seguida de una supervivencia menor en viejas y maduras y mayor en las longevas.
2. Las hembras ICR-CD1 maduras que sobreviven tras recibir 50 mg/kg de LPS, el 20% del total, presentan una mejor capacidad de digestión de los leucocitos, mayor respuesta linfoproliferativa y especialmente más actividad catalasa, antes de serles administrada la endotoxina. Tras recibir el LPS, las supervivientes muestran unas funciones y estado redox de sus células inmunitarias, al menos en las primeras horas del shock, en mejores condiciones que los animales que no supervivientes.
  3. El tratamiento hormético llevado a cabo mediante la administración de 0,1 mg/Kg de LPS, como hormetina, en ratonas maduras, produce una mejor respuesta conductual en la vejez de estos animales tanto en la capacidad sensoriomotora como en la exploratoria, asemejándose a la que muestran los adultos. Esta estrategia hormética mejora funciones inmunitarias y parámetros de estado redox en los leucocitos peritoneales en la vejez, alcanzándose valores semejantes a los de adultos. Además, ese mismo tratamiento hormético llevado a cabo en ratones con envejecimiento prematuro (PAM) también mejora, en la vejez, los parámetros de conducta y la funcionalidad y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Tras la administración de 50 mg/kg de LPS, la respuesta funcional y redox de esas células resulta más adecuada en los que recibieron hormesis, lo que se acompaña de una mayor supervivencia de los animales.

4. La ingestión de una dieta suplementada con un 0,1 % p/p de N-acetil cisteína (NAC) y tioprolina (TP) durante cuatro semanas, en animales adultos, viejos y longevos, mejora las funciones y estado redox de los leucocitos peritoneales, especialmente en la vejez. La administración de un shock endotóxico con 50 mg/kg de LPS, produce una mejor respuesta funcional y redox en las células de los animales que ingirieron la dieta con antioxidantes en comparación con los controles, en general, en todas las edades, y en algunos parámetros fundamentalmente en las adultas y longevas. Todo ello repercute en una mayor supervivencia de estos animales.
  
5. Los ratones viejos de la cepa C57BL6/129 hembras, muestran una mejor condición basal en las funciones y estado redox de sus leucocitos peritoneales, en comparación con los machos. También presentan una mejor respuesta funcional y de estado redox tras la administración de 50 mg/kg de LPS, lo que se acompaña de una mayor supervivencia. Estas respuestas, en las hembras viejas de esta cepa, son, en algunos aspectos, diferentes a las mostradas por las hembras de la cepa ICR/CD1 de la misma edad. La supervivencia de las hembras de la cepa C57BL6/129, a diferentes edades y frente a diferentes cantidades de LPS, es mayor que la de los machos.

Como **conclusión general** se puede indicar que la edad cronológica y biológica del individuo es fundamental a la hora de condicionar la respuesta inmunitaria frente a un mismo proceso infeccioso y consecuentemente determinar su supervivencia. Los tratamientos horméticos y con dietas

enriquecidas en antioxidantes, como la NAC y la TP, permiten mejorar el estado inmunitario y redox de los individuos y su respuesta frente a un shock endotóxico, lo que se acompaña de una mayor supervivencia. La cepa de ratones y, especialmente el sexo, condicionan la respuesta inmunitaria y la supervivencia a la infección.



***Age-related changes in the function and redox state of peritoneal leukocytes of mice subjected to an endotoxic shock. Effects of hormetic and nutritional interventions.***

Endotoxic shock represents, due to its high mortality rate, one of the most important challenges for current medicine, primarily for the intensive care units. Although many infections can evolve to a septic shock, gram negative bacteria are the main responsible ones for this clinic situation given that they are able to liberate specific lipopolysaccharides (LPS) from their cellular membrane, acting as endotoxins. The instauration and progression of an endotoxic shock involve several integrated and antagonistic processes, which imply initially an exacerbated inflammatory response which is followed by a suppression of the immune response, which tries to counteract the initial response. These phases are known as hyperdynamic and hipodynamic phases, respectively. It is assumed that if the immune response to infection, in which high amounts of oxidants and inflammatory compounds are liberated to fight the pathogens, is not well regulated, causes the multiorganic failure responsible for the individual's death.

With advancing age, the susceptibility to suffer an infection increases and the levels of the infectious agent that are required to cause a lethal endotoxic shock decrease. This fact could be related to the changes that the immune system undergo when aging, a process which is known as immunosenescence and that implies a higher and worse regulated oxidative and inflammatory stress.

Given that the immune system is an essential physiological system for the preservation of health and due to it has been demonstrated that it actively participates in the aging rate of an individual, the knowledge of the changes that

the immune cells undergo during aging and how they respond to an infectious process becomes essential in order to understand the higher susceptibility to infections in the elderly.

On the other hand, given that long-lived individuals (both mice that naturally reach a high longevity as well as human centenarians) show functional and redox parameters in its immune cells similar to the ones from healthy adults, the immune system becomes an excellent biomarker of the biological age and longevity. Thus, the study of how long-lived mice respond to infection becomes needed.

If, as mentioned above, the immune system can be indicative of the aging rate of an individual or of its biological age, there can be individuals that being the same chronological age present differences in their biological age and whose immune responses to infection can be different, and consequently their survival. However the immune parameters that are more interlinked with a better response to an endotoxic shock are still unknown.

Among the lifestyle strategies to improve the immune system status, the dietary supplementation with antioxidants has been shown to be the most effective one, especially in the elderly, being able to bring back the immune parameters most affected in the elderly to normal values typical for adults. Due to the effectiveness that has shown, in this sense, the supplementation with two thiolic antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and tioprolina (TP) and due to NAC has also been shown to improve the survival of young mice after a lethal endotoxic shock, we wanted to see the effects of this diet in the immune response to infection and if this one depends on the age.

On the other hand, hormetic strategies are becoming more popular in the context of slowing down the aging process. A hormetic treatment, using as a hormetin the administration of low doses of LPS during the adult age could rejuvenate the functionality and redox state of immune cells improving its ability to respond to a lethal endotoxic shock in the elderly, in chronologically old mice as well as in prematurely aging mice (PAM).

Based on the above, the hypothesis stated is: the changes in the functional and redox state of immune cells of mice after the administration of a specific dose of endotoxin and the survival outcome of the animal will depend on the chronological and biological age of the individual. The hormetic and nutritional strategies (dietary supplementation with antioxidants) will improve the functionality and redox state of immune cells and consequently the survival after the endotoxic shock. There will be differences depending on the sex and strain used.

To answer this hypothesis, the following objectives have been stated:

**First objective:** Study of the changes in the functional and redox state of peritoneal immune cells from female ICR-CD1 mice at the adult, mature, old and long-lived age as well as their survival after an endotoxic shock caused by the administration of *E.coli* lipopolysaccharide (LPS).

**Second objective:** Comparison of the changes in the functional and redox state of peritoneal immune cells from female ICR-CD1 mice at the mature age that survived or died after the administration of 50 mg/kg LPS dose.

**Third objective:** Study of the effect of a hormetic strategy based on the administration of low doses of LPS in female ICR-CD1 mice at the adult age, on

behavioural, functional and redox state parameters in chronologically old mice, prematurely aging mice (PAM) as well as in mice that were subjected to a lethal endotoxic shock in the elderly comparing to the respective controls.

**Fourth objective:** Study of the effect of the dietary supplementation with two thiolic antioxidants: 0,1% N-acetilcistein (NAC) + 0,1% tioproline (TP), on the functionality and redox state of peritoneal immune cells from female ICR-CD1 mice at the adult, old and long-lived age with an endotoxic shock caused by the administration of *E.coli* lipopolysaccharide (LPS).

**Fifth objective:** Deepening in the model of lethal endotoxic shock using female and male old C57BL6/129 mice studying the functional and redox state changes of peritoneal immune cells. Study of the survival of C57BL6/129 mice, at different ages, with different LPS doses and in both sexes.

The results from the first objective showed that there is an age-related decline in the functional and redox state of peritoneal immune cells, which was not observed in long-lived mice. Adult and long-lived mice showed a better response after the endotoxin administration (50 mg/kg LPS) with higher stimulation of chemotaxis, phagocytosis, intracellular superoxide anion, lymphoproliferation and natural killer activity as well as in the antioxidant activity of catalase (CAT) and the levels of glutathation (GSH); changes that were not observed at other ages. These changes are responsible of the survival of mice at a LPS dose of 50 mg/kg, dose that caused a lethal endotoxic shock in all the ages studied but not in the adult one. In the adult age, the 50 mg/kg dose produced a reversible endotoxic shock, being the 100 mg/kg dose of LPS the one that produced a lethal one. After this dose however, the changes in the functional and redox state of peritoneal immune cells were different

to the ones after the 50 mg/kg dose. The 25 mg/kg dose used in old mice also produced different changes in the functional and redox state of peritoneal immune cells that the ones observed after the 50 mg/kg dose, although both doses were lethal.

Regarding the second objective, the results demonstrated that the survival percentage of mature mice after a 50 mg/kg dose was 20%, whereas the resting 80% died within 62 hours after administration. The ones that survived showed in their peritoneal immune cells, before the administration of the endotoxin, better digestion ability, a better lymphoproliferative response to LPS and a higher catalase activity comparing to the ones that did not survive. After the endotoxic shock, the ones that survived preserved the digestive and lymphoproliferative abilities, natural killer activity and glutathione levels during the first hours and did not experience a decline in catalase activity, being these conditions indicative of a better response to endotoxemia and responsible of the differences in survival.

In relation to the third objective, the hormetic treatment based on the administration of LPS (0,1 mg/kg LPS) in mature mice in four sessions every fifteen days caused an improvement in the behavioural response in the elderly both in sensor-motor as well as in exploratory abilities being the response similar to the adult ones and consequently better than the response of the corresponding old control mice. This hormetic strategy also improved the functional and redox state parameters of the peritoneal immune cells in the elderly, being these parameters similar to the ones from adults. Indeed, this strategy also improved the motor coordination and exploratory capacity of old PAM as well as their functional (chemotaxis, phagocytosis, digestion, lymphoproliferation and NK activity) and

redox state parameters (increase of catalase activity and GSH levels, decrease of superoxide anion and xantine oxidase activity). After the administration of the endotoxin, the animals subjected to the hormetic treatment showed a better function and redox state of their immune cells which was reflected by a higher survival.

The results from the fourth objective indicate that the dietary supplementation with thiolic antioxidants (0,1% p/p NAC y TP) over four weeks in adult, old and long-lived mice improves the immune function (phagocytosis, digestion and lymphoproliferation in response to mitogens) and redox state (higher catalase activity and GSH levels and lower extracellular superoxide anion and XO) of peritoneal leukocytes in a higher degree in the elderly. The administration of the 50 mg/kg LPS dose produced a better functional and redox response of the immune cells of the animals that ingested the diet comparing to the controls, which was reflected by a higher survival.

With respect to the fifth objective, old female C57BL6/129 mice showed a better basal state in their peritoneal leukocytes in certain parameters such as lymphocyte chemotaxis, phagocytosis, digestion and XO activity comparing to old male C57BL6/129 mice. After the endotoxin injection (50 mg/kg LPS), female mice also showed a better functional and redox response of the immune cells (chemotaxis, phagocytosis, digestion, NK activity and GSH levels) which was reflected by a higher survival, comparing to male mice. Old female C57BL6/129 showed differences in functional and redox state parameters comparing to old female ICR-CD1 mice. The mortality rate in male mice was, in general, higher than the one of female mice, at different ages and LPS doses.

The main conclusions are:

1. In female ICR/CD1 mice there is an age-related decline in the function and redox state of peritoneal leukocytes, decline that is not observed in long-lived mice, which, in general, maintain similar values to the adults. This basal state is going to influence the functional and redox changes after the intraperitoneal administration of 50 mg/kg LPS dose. In general, in adult and long-lived mice there is a stimulation of several functions and antioxidant defences studied, that is not seen in other ages. The functional and redox responses are different in adult and old mice after the administration of a lethal endotoxic shock at a dose of 100 mg/kg and 25 mg/kg, respectively. The administration of 50 mg/kg LPS dose, causes a lethal endotoxic shock in all the ages studied but not in the adult one, being the survival higher in the long-lived mice than in mature and old mice.
2. Mature female ICR-CD1 mice that survived, 20% of the mice, after the administration of 50 mg/kg LPS dose presented at the basal state, before the administration of the endotoxin, a better digestion capacity, a higher lymphoproliferative response and higher catalase activity. After the LPS injection, the mice that survived show functions and redox state, at the first hours of the shock, in better conditions than the ones that did not survive.
3. The hormetic treatment caused by the administration of 0,1 mg/kg LPS as a hormetin in mature mice, produces a better behavioural response in the elderly (sensor-motor and exploratory abilities) being similar to the response in adult mice. This hormetic strategy also improves the function

and redox state of peritoneal leukocytes in the elderly, acquiring values similar to the ones found in the adult. Moreover, when the hormetic strategy is performed in PAM, it also improves the behavioural, functional and redox state parameters. After the administration of a 50 mg/kg LPS dose, the functional and redox response of the immune cells was better in the immune cells from mice subjected to the hormetic treatment, which is accompanied by a higher survival of the animals.

4. The dietary supplementation with thiolic antioxidants (0,1% p/p NAC and TP) during four weeks in adult, old and long-lived mice improves the functional and redox state of peritoneal leukocytes, especially in the elderly. After the administration of a 50 mg/kg LPS dose, the functional and redox response of the immune cells was better in the immune cells from mice subjected to the dietary supplementation comparing to the controls in all the ages studied, especially in adult and long-lived mice. All this cause these animals to have a higher survival.
  
5. Old female C57BL6/129 mice show a better basal state regarding the functional and redox state of their peritoneal leukocytes comparing to the old male group. They also show a better functional and redox response after the administration of a 50 mg/kg LPS dose, which is accompanied by a higher survival. However, this response in old female C57BL6/129 mice is different in certain aspects to the one seen in old female ICR/CD1 mice. The survival of female C57BL6/129 mice at different ages and at different LPS doses is, in general, higher than the one found in male mice.



As a general conclusion it can be stated that both the chronological as well as the biological age of the individual are fundamental to determine the immune response against a certain infectious process and consequently the survival. Both the hormetic treatment as well as dietary supplementation with antioxidants (NAC and TP) improve the function and redox status of the immune system and the response against an endotoxic shock, which is accompanied by a higher survival. The specific strain of mice and especially the sex of mice determine the immune response as well as the survival to an endotoxic shock.

## ***Introducción***

---

## **1. Introducción:**

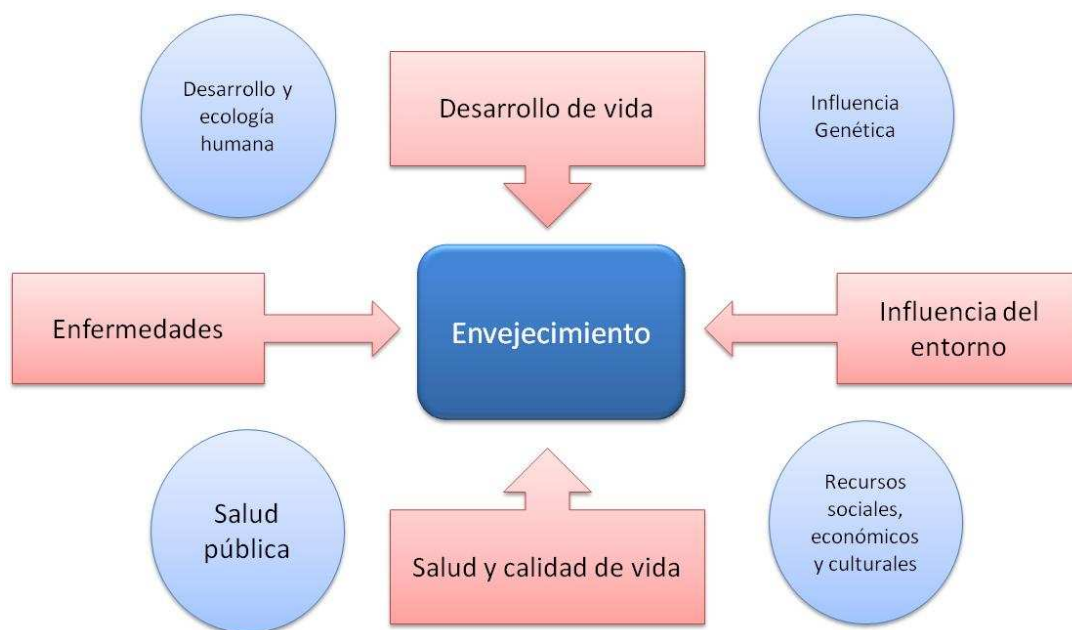
### **1.1. El envejecimiento**

#### **1.1.1. Definición del envejecimiento**

A simple vista es sencillo distinguir un individuo joven de una persona mayor, sin embargo definir el proceso de envejecimiento resulta mucho más complejo de lo que pueda parecer en un primer momento, hay numerosas definiciones, pero todas coinciden en una idea: *“Cambios que ocurren en nuestras células y tejidos a lo largo del tiempo, los cuales propician la pérdida progresiva de la homeostasis del organismo”*. La Organización Mundial de la Salud (OMS), lo define como un proceso biológico, que da lugar a una serie de cambios fisiológicos, característicos de cada especie, que tiene como consecuencia una limitación de la capacidad de adaptación del organismo al ambiente. Además, la propia OMS ha introducido el concepto de envejecimiento activo, definiéndolo como: *“El proceso de hacerse mayor sin envejecer mediante el desarrollo continuado de actividades físicas, sociales y espirituales a lo largo de toda la vida”*.

El proceso de envejecimiento está muy influenciado por los efectos de los estados del entorno, del estilo de vida y de las enfermedades, que, a su vez, están relacionados con el envejecimiento o cambian por su causa pero que no se deben al envejecimiento en sí (ver figura 1). A menudo, lo que una vez se consideró que era una consecuencia del envejecimiento normal se atribuye ahora, más apropiadamente, a factores relacionados con el envejecimiento. En este contexto, el envejecimiento se ha definido como un “deterioro de las funciones progresivo y generalizado, que produce una pérdida de respuesta adaptativa al estrés y un mayor riesgo de sufrir enfermedades relacionadas con la edad” (Kirkwood *et al.*, 1998).

Otra de las definiciones más utilizadas que relaciona el proceso de envejecimiento con la degradación del sistema fisiológico, es la descrita por Richard Miller (1994): *“El envejecimiento es un proceso que convierte a los adultos sanos en sujetos frágiles, con una disminución en la reserva de la mayoría de los sistemas fisiológicos y una vulnerabilidad exponencial a la mayoría de las enfermedades y a la muerte”*.



**Figura 1.** Parámetros que influyen en el proceso de envejecimiento (Envejecimiento: Fundación CSIC, 2010).

Otros autores definen envejecimiento como un proceso de cambios biológicos con el tiempo, cuya principal manifestación es el deterioro orgánico generalizado y la pérdida progresiva de funciones a cualquier nivel de organización biológica, desde el molecular al poblacional (Miquel *et al*; 1980; Miquel, 1984, 1986). Shock en 1970, lo definió como una pérdida progresiva de rendimiento, de homeostasis y de resistencia a los estreses medioambientales. Desde un punto de vista

Biogerontológico, se define el envejecimiento como “*la serie de modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales que aparecen como consecuencia de la acción del paso del tiempo sobre los seres vivos*” (Castanedo *et al.*, 1999).

El proceso de envejecimiento está caracterizado por ser: A) *Universal*, ya que tiene lugar en todas las especies animales, B) *Intrínseco*, pues las causas del proceso tienen un origen endógeno, C) *Progresivo*, debido a que la velocidad a la que se envejece tras la edad adulta es similar a lo largo de la vida y D) *Deletéreo*, ya que tiene un carácter perjudicial para el individuo (Strehler, 1977).

### 1.1.2. Conceptos de longevidad media y máxima

La esperanza de vida media o *longevidad media*, es la media de tiempo de vida que alcanzan los individuos de una población. En el caso del ser humano, en las últimas décadas, los países desarrollados han experimentado una importante mejoría en las condiciones higiénico-sanitarias y nutricionales, que han conducido a una mejor calidad de vida y a un aumento significativo de la esperanza de vida media de la población (Tröen, 2003). Sólo en España, los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), muestran que hay censadas un total de 7.877.778 personas con 65 años o más, lo que supone el 17,06% de la población española (INE, 2011). España ocupa el cuarto lugar en el escalafón de países más envejecidos del mundo, encabeza la lista Japón, seguida de Italia y Alemania (Naciones Unidas, 2010). En la actualidad, se estima que para el año 2050 la población mundial envejecida (mayores de 80 años), se triplicará acercándose a unas 400 millones de personas (Belsky *et al.*, 2015).

La *longevidad media* puede variar en función del estilo de vida y de los factores ambientales, los cuales se estima que influyen en un 75% sobre el estado de salud

de un individuo, haciéndolo los genes en un 25% (Kirkwood, 2000, 2008; De la Fuente 2009). Por lo indicado, el interés por el campo de la gerontología ha ido en aumento, y cada vez más científicos tratan de averiguar cómo se producen los procesos de envejecimiento, cuáles son sus consecuencias y qué tipo de intervenciones pueden lograr un aumento en la esperanza de vida media a través de un enlentecimiento de la aparición del deterioro fisiológico característico de la vejez (Hayflick, 2000; Burch *et al.*, 2013; Golman *et al.*, 2013). Por su parte, la esperanza de vida máxima o *longevidad máxima*, es decir, el número máximo de tiempo que pueden vivir los individuos de una determinada especie, 120 años en la especie humana, no puede modificarse, sino que es propia de cada especie y en ella interviene el componente genético (Tröen, 2003).

### **1.1.3. La edad biológica**

Un hecho destacable e importante del envejecimiento es su *heterogeneidad*. Los cambios con el tiempo en los diversos niveles de organización biológica, desde las moléculas, células, tejidos y sistemas, tienen lugar a diferente velocidad y de forma distinta, tanto en cada uno de los niveles antes mencionados, y en los distintos individuos de una misma población que haya nacido en la misma fecha. Este hecho hizo surgir, el concepto de "*edad funcional*" utilizado para decidir la edad de jubilación de individuos dedicados a la aviación (MacFarland, 1953). Posteriormente, esas variaciones interindividuales del estado fisiológico, bioquímico y psicológico, de sujetos con igual edad cronológica pasaron a constituir lo que se denominó "*edad biológica*"; concepto desarrollado por Comfort y que resultaba más acertado que la "*edad funcional*", puesto que incluye no sólo las características funcionales sino también las no funcionales (Comfort, 1969).

La investigación más completa sobre la edad biológica fue realizada por Borkan y Norris (1980), en un estudio longitudinal sobre más de mil personas. El análisis retrospectivo de dicho estudio mostró que los sujetos que presentaban ciertos parámetros más envejecidos que la mayoría de individuos de su misma edad cronológica, tenían menor esperanza de vida. Por ende, el análisis de “*edad biológica*” es de gran utilidad para conocer la eficiencia de las estrategias que permitan al ser humano aumentar su longevidad. Actualmente, no se dispone de parámetros adecuados para la valoración de edad biológica. Nuestro grupo de investigación ha propuesto una serie de parámetros de función inmunitaria como marcadores de la edad biológica de los individuos, al relacionarse claramente con la longevidad media de los mismos (De la Fuente, 2009a; De la Fuente *et al.*, 2011; De la Fuente, 2014).

### 1.1.4. Teorías del envejecimiento

Durante muchos siglos se han propuesto un gran número de teorías para explicar la naturaleza del envejecimiento, y así en la revisión de Medvedev (1990), ya se recogen más de trescientas. Es evidente que el envejecimiento es multifactorial, pero muchas de esas teorías no disciernen en las causas y en las consecuencias de ese complejo proceso que es el envejecimiento, y actualmente, muchas de ellas ya sólo tienen valor histórico. Otro autores han revisado posteriormente las teorías sobre el envejecimiento (Mishara y Riedel, 2000; Pardo, 2003; Miquel, 2006; Miquel, 2006a; Viña *et al.*, 2007; De la Fuente 2009). Todas esas teorías pueden agruparse en dos grandes apartados. El primero de ellos acogería a las “*Teorías deterministas*”, esto es, aquellas que consideran a los genes como únicos responsables del envejecimiento. El otro gran grupo, las “*Teorías*

*estocásticas*”, incluye todas la que teniendo en cuenta la participación de los genes otorga también el papel relevante a los factores ambientales (De la Fuente, 2009).

Entre las teorías deterministas se pueden mencionar la del *límite de la duplicación celular*, propuesta por Leonard Hayflick a finales de la década de los setenta. Hayflick observó que los fibroblastos *in vitro* tenían una limitación del número de duplicaciones antes de su senescencia y muerte *in vitro*, fenómeno denominado “*Límite de Hayflick*”. En esta misma línea se encuentra la teoría del “*acortamiento de los telómeros*”. En cada división celular se van perdiendo fragmentos de ADN en los extremos de los cromosomas (telómeros), lo que hace que se acorten cada vez que una célula se divide. Así, este acortamiento se relaciona con el número de mitosis que ha experimentado una población celular (Olovnikov, 1973; Kang, 2002; Goyns, 2002). Las células inmortales se protegen contra el acortamiento de los telómeros gracias a la actividad de la telomerasa, que reemplaza las secuencias teloméricas perdidas. Así, manteniendo telómeros de tamaño constante, se preserva la capacidad mitótica *in vitro* (Viña *et al.*, 2007). En este sentido, Goyns (2002) indicó las siguientes observaciones: (1) En las células postmitóticas (de escasa o nula proliferación), los telómeros no se acortan significativamente durante la vida animal; (2) Las células germinales (que proliferan con frecuencia) muestran una gran actividad de telomerasa, que preserva su capacidad mitótica y (3) los fibroblastos, células epiteliales y otras células intermitóticas (que experimentan un número relativamente escaso de divisiones a los largo de la vida en el organismo) carecen de telomerasa, probablemente no la necesitan, ya que no llegan a agotar su capacidad mitótica *in vivo*. Carlson y Riley (1998), consideran que a pesar del interés de los telómeros y de la telomerasa en relación a los procesos normales de la mitosis y la



diferenciación celular, no hay pruebas de que esos procesos que suceden *in vitro* en las células en cultivos sean relevantes para comprender el envejecimiento del organismo. Por ello, no parece justificado proponer una teoría general del envejecimiento normal basada en la acción de los telómeros y telomerasa (Miquel, 2009).

En el grupo de teorías estocásticas se pueden destacar, entre otras cosas, las teorías basadas en el envejecimiento de los sistemas fisiológicos, dado la demostrada disminución del rendimiento funcional que tiene lugar al envejecer. Una de esas teorías en la “*inmunológica*”, postula que el envejecimiento se debe a una disminución de las defensas del organismo frente a infecciones y agentes extraños (Walford, 1969; Makinodan y Kay, 1980; Walford *et al.*, 1981). Otra teoría estudiada es la “*neuroendocrina*”, que se basa en los cambios degenerativos del sistema nervioso y endocrino con la edad, dos sistemas homeostáticos que mantienen estable el medio interno frente a las perturbaciones (Lefreré y Berche, 2010).

Otras teorías como las “*moleculares*”, son por ejemplo la de “*acumulación de productos de desecho*” basada que en todas las células postmitóticas se van acumulando, con el tiempo, productos del metabolismo que no pueden ser renovados, de entre los cuales el más característico corresponde a los gránulos de lipofucsina, compuesto insolubles y probablemente oxidados, los cuales, en gran medida parecen originarse de los lisosomas y las mitocondrias. Por otro lado, *la teoría de los entrecruzamientos* involucra la participación del metabolismo celular como productor de sustancias que favorecen la unión de macromoléculas, como el ADN o las proteínas, proceso que aumenta la resistencia de estas moléculas a su degradación y, en el caso del ADN, puede dar lugar a mutaciones (Björkstén, 1976).

La glicosilación de las proteínas u otras moléculas, estaría relacionada con esta teoría y es un hecho muy estudiado actualmente por su implicación en numerosas condiciones patológicas asociadas con el envejecimiento (Birren *et al.*, 1996). La *teoría de las mutaciones somáticas* propuesta por Szilard (1959), postula que el envejecimiento ocurre como resultado de la acumulación de las mismas en el ADN nuclear de las células somáticas. Otros investigadores afirmaron que la lesión del ADN ocurría fundamentalmente a nivel mitocondrial (Miquel *et al.*, 1980, 1982, 1984 y 1998). La teoría propuesta por Orgel (1963) sobre *errores catastróficos*, sugiere que el envejecimiento está ligado a errores en la transcripción del ARN y en su traducción de proteínas, lo cual conlleva a una acumulación de proteínas alteradas, no funcionales. No obstante, otros autores indican que los cambios en las proteínas son efectos a posteriori y no reflejan una pérdida de actividad en los mecanismos biosintéticos (Rothstein, 1981; Fleming *et al.*, 1986).

Una de las teorías que goza actualmente de una mayor aceptación entre los gerontólogos es la *teoría de los radicales libres*, propuesta por Harman en 1956, y posteriormente perfilada por otros autores, (Harman, 1972; Miquel *et al.*, 1980; Miquel y Fleming, 1986; Miquel, 1992; Barja, 2004) (Figura 2). Esta teoría propone que los radicales libres derivados de la inexorable utilización del oxígeno por la células, son los responsables del daño oxidativo de las biomoléculas asociado a la edad. Estos radicales son altamente reactivos e inestables, producen una desorganización gradual de las estructuras celulares, como consecuencia de las reacciones de peroxidación lipídica, de oxidación de proteínas, glúcidos y ADN.

Esta teoría aporta una respuesta apropiada a la pregunta de *cómo* se produce el envejecimiento, proxidación. Para responder *dónde* se inicia el proceso se emitió la *teoría mitocondrial* (Harman, 1972; Miquel, 1980; Miquel *et al.*, 1986;

Barja 2000, 2013). Esta teoría sugiere que la senescencia en un producto derivado del ataque de los radicales libres de oxígeno al genoma mitocondrial en células postmitóticas. Confirmando esta idea se encuentra el hecho de que las mitocondrias de especies que viven menos tiempo producen cantidades mayores de radicales libres (RL) que las procedentes de especies que viven más (Sohal *et al.*, 1990; Barja 2000, 2013).

Dada a la continúa producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species), y su gran capacidad de oxidación, el organismo presenta una serie de defensas antioxidantes que previenen de la formación excesiva de ROS o los neutralizan tras su generación. Sin embargo, estos mecanismos de defensa no son infalibles, de modo que cuando se produce un desequilibrio entre los compuestos oxidantes y las defensas antioxidantes, causado por un exceso de ROS o una menor disponibilidad de los antioxidantes, dando lugar a una situación de “*estrés oxidativo*” que resulta en el daño celular (Sies, 1986). A pesar de esto, no podemos olvidar que el oxígeno es esencial para la vida, y de hecho, las ROS en concentraciones adecuadas intervienen en una variedad de procesos fisiológicos que son fundamentales para nuestra supervivencia (Knight, 2000; Yoon *et al.*, 2002; Piscochi y Pop, 2015; Seis, 2015).

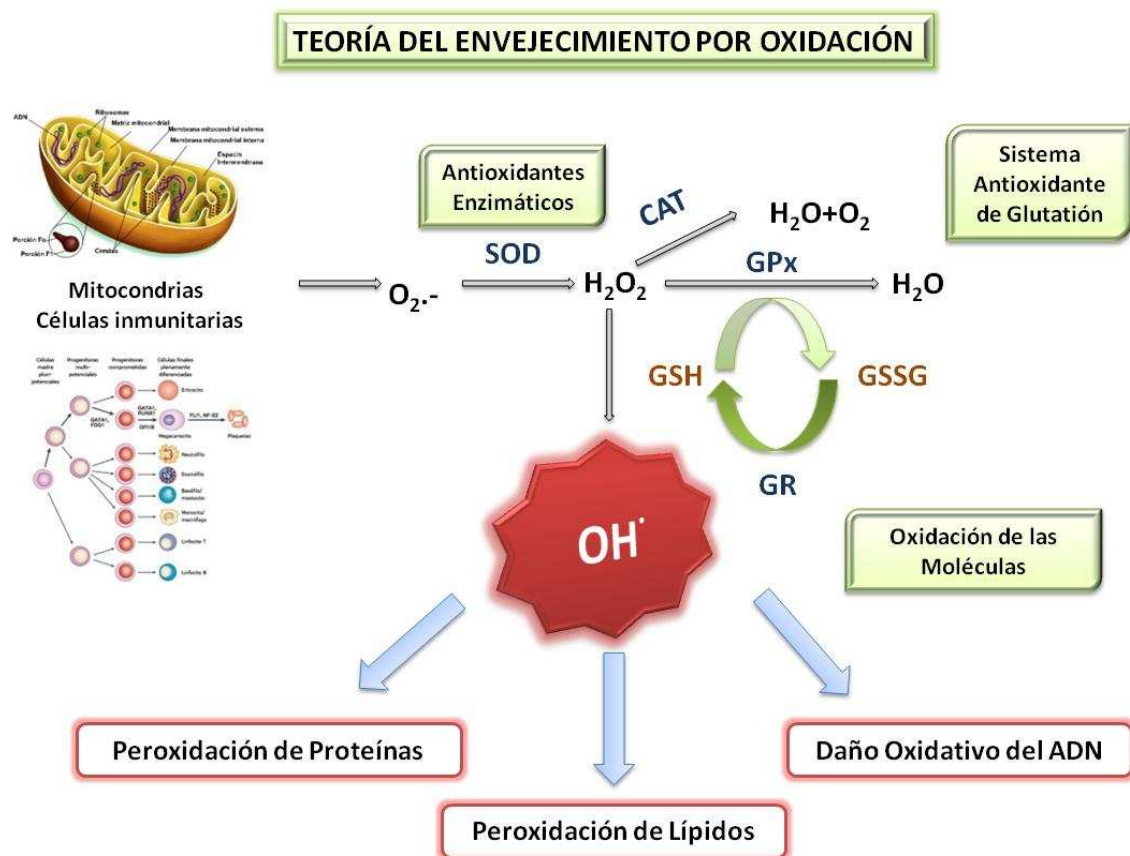
En este contexto se puede mencionar el concepto de *Mitohormesis* teoría que se basa en los "efectos horméticos" que pueden generar las ROS (Ristow y Schmeisser, 2014). El concepto de hormesis que será comentado más adelante, describe acciones beneficiosas resultantes de la respuesta de un organismo a un factor estresante de baja intensidad. En la mitohormesis se sugiere que la formación de radicales libres y ROS en cantidades determinadas dentro de las mitocondrias, causan una inducción secundaria de mayor capacidad de defensa

antioxidante (Schulz *et al.*, 2007), produciéndose una respuesta adaptativa al estrés oxidativo generándose defensas antioxidantes y otros factores de protección, tales como proteínas de estrés (Feinendegen *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1996; Saint-Georges *et al.*, 2004; Tapia, 2006; Shankar *et al.*, 2006, Tapia, 2006, Martínez de Toda y De la Fuente, 2015).

Otro grupo de teorías que explican el *porqué* del envejecimiento son “*las teorías evolutivas*”, la cuales conectan como el desajuste entre la supervivencia tardía y fecundidad temprana, y postula que la senescencia es una adaptación necesaria debido a que sin ella el recambio y renovación de las poblaciones de las distintas especies resultaría perjudicial (Kirkwood y Rose, 1991).

Se hace evidente por todo lo indicado, que una sola teoría no explica totalmente el envejecimiento. Basado a esto aparece “*La teoría integradora del envejecimiento*” que ofrece una explicación satisfactoria sobre las causas celulares y moleculares de ese proceso, y que se recoge en la revisión de De la Fuente y Miquel, (2009). Nuestro grupo de investigación ha propuesto “*la teoría de la oxidación-inflamación*”, en la que se postula que el envejecimiento es un estrés oxidativo e inflamatorio crónico que afecta a todas las células del organismo, pero de forma especial a las de los sistemas reguladores: el nervioso, el endocrino y el inmunitario, y a la conexión entre los mismos, alterando la homeostasis, y por ello aumentando la morbilidad y mortalidad. Además, el sistema inmunitario, dada a su necesaria producción de oxidación y compuestos pro-inflamatorios para llevar a cabo su trabajo puede, si no está bien regulado, incidir aumentando la oxidación e inflamación general del organismo. Así, esta nueva teoría propone que es sistema inmunológico puede jugar un papel fundamental no como la causa importante del envejecimiento, sino como un mecanismo que modifica la velocidad a la que

sucede el mismo (De la Fuente y Miquel, 2009). Si el grupo de Franceschi acuñó el término "*inflamm-aging*" (Salvioli *et al.*, 2006; Franceschi, 2007), nuestro grupo más recientemente y en base a la teoría antes comentada propuso el de "*oxi-inflamm-aging*", como más indicativo de lo que sucede al envejecer (De la Fuente y Miquel, 2009).



**Figura 2. Teoría de la oxidación o de los radicales libres del envejecimiento.** El envejecimiento es el resultado de la acumulación de daño oxidativo a biomoléculas causado por la alta reactividad de los radicales libres (RL) producidos en las células, especialmente en las mitocondrias, como resultado del necesario uso del oxígeno. Otras fuentes de RL son los leucocitos. El primer RL que aparece en las células es el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que se transforma en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), una especie reactiva de oxígeno (ROS del inglés: "reactive oxygen species") y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el RL más reactivo, que lleva a cabo la oxidación de biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN. Las células han desarrollado múltiples mecanismos antioxidantes para defenderse de la toxicidad del oxígeno. Destacan las enzimas superóxido dismutasa (SOD), que transforma el  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , y catalasa (CAT), que neutraliza éste último. El glutatión reducido (GSH) es el antioxidante no enzimático más importante que presenta el organismo para eliminar el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a través de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), que lo transforma en su forma oxidada (GSSG). La enzima glutatión reductasa (GR) se emplea para devolver al glutatión a su forma reducida.

## **1.2. El sistema inmunitario y la inmunosenescencia**

### **1.2.1. El sistema inmunitario**

Desde que nacemos nos encontramos continuamente expuestos a padecer infecciones y procesos cancerosos, frente a los cuales nuestro organismo sucumbiría, si no fuera porque disponemos de un complejo sistema fisiológico que nos protege como es el sistema inmunológico. Este sistema está constituido por una serie de células, los leucocitos y moléculas que producen las mismas, que circulan por nuestro organismo y que son capaces de reconocer y eliminar un número ilimitado de diferentes agentes extraños, no solo de carácter infeccioso, sino también aquellas células que se nos van transformando en cancerosas, hecho que sucede constantemente. Para destruir lo extraño, el sistema inmunitario funciona poniendo en marcha una serie de mecanismos, que se manifiestan en diferentes fases o etapas: En la primera, las células inmunitarias tienen que reconocer lo extraño, lo que se denomina "*antígeno*", a través de cual se "*informa*" de la presencia del mismo. A continuación, estos leucocitos deben activarse para poder llevar a cabo adecuadamente la tercera y última de las etapas, la eliminación de ese antígeno, hecho que culmina con el estado de inflamación. La segunda etapa que corresponde con la activación, es un conjunto de procesos que se encuentra perfectamente regulados, ya que si esta activación se ve descontrolada podría suponer una inadecuada activación del sistema inmunitario, desencadenando una destrucción de estructuras propias del organismo.

### **1.2.2. La inmunosenescencia**

A pesar de la relevante importancia fisiológica del sistema inmunitario este no se ve libre de los efectos del paso del tiempo, produciéndose un deterioro

funcional y que supone la disminución de algunas funciones y la sobre-activación de otras. Esta reestructuración que experimenta al envejecer se denomina “*Inmunosenescencia*”, término que acuñó por primera vez Roy Walford (1969).

Los datos que hay sobre los cambios que experimenta el sistema inmunológico al envejecer son en ciertos aspectos incompletos y contradictorios. Esto se debe a motivos diversos como las edades elegidas para comparar los cambios, las diferencias entre especies, así como la diversidad interindividual manifestada en cada especie, el parámetro estudiado y el momento del día en que se realiza, la presencia de una u otras células en los estudios *ex vivo*, como muchos otros factores que puede dar resultados distintos (Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011; Maté *et al.*, 2014).

Uno de los mejores aspectos estudiados en relación con la inmunosenescencia son las variaciones que ocurren en la composición de las poblaciones leucocitarias, y en la expresión de los marcadores de superficie. De hecho, al envejecer se pierde el equilibrio entre el linaje linfoide y mieloide, mostrándose una tendencia de los progenitores de estos últimos (mieloides) y una disminución de los primeros (Shaw *et al.*, 2010).

Los linfocitos T han sido una de las células inmunitarias más estudiadas en este contexto y de las que experimentan en mayor grado cambios inducidos por el proceso de envejecimiento (Solana y Pawelec, 1998; Pawelec, 2002, Taub y Longo, 2005; Thiault *et al.*, 2015). No todas las sub-poblaciones de células T se modifican igual al avanzar la edad. Así, se ha comprobado que los linfocitos CD4+, o bien no experimentan modificaciones o disminuyen con el paso del tiempo de forma más acusada que los CD8+ (Pawelec, 2012). Sin embargo, otros autores han indicado una expansión clonal con el envejecimiento de estos tipos celulares,

principalmente de los linfocitos CD8+, pero también de los CD4+ (Maini *et al.*, 1999), siendo la mayoría de ellos negativos para el marcador CD28 (Boucher *et al.*, 1998). La pérdida de este marcador coestimulador, supone que la mayoría de estos linfocitos están en un estado de reposo, en el caso de los CD8+ (Franceschi *et al.*, 1999), o son incapaces, en el caso de los CD4+, de promover la diferenciación y la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Además, en ambas subpoblaciones, las células vírgenes son las que principalmente van decayendo al envejecer (Chen *et al.*, 2002).

Se ha comprobado también que los linfocitos  $T\gamma\delta$  disminuyen con el envejecimiento, si bien sufren un aumento de la expresión del marcador de activación CD69 (Colonna-Romano *et al.*, 2002). Recientemente, se ha mostrado que las células T reguladoras, de carácter supresor, aumentan en número con la edad, mientras que parecen mantener su capacidad funcional, lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor actividad supresora en los individuos ancianos (Gregg *et al.*, 2005; Trzonkowski *et al.*, 2006).

Los linfocitos B y sus precursores disminuyen con la edad, a pesar que la médula ósea no involuciona al envejecer (Frasca *et al.*, 2008). Igualmente, las células pre-B muestran una menor capacidad para madurar hacia células B y una elevada susceptibilidad a las apoptosis (Szabo *et al.*, 1999; Weksler y Szabo, 2000; Allman y Miller, 2005). Además, se han estudiado diversos biomarcadores que han contribuido para evidenciar la disminución de la función de estas células con la edad, que podría indicar la reducción en número de las mismas (Blomberg y Frasca, 2013). Sin embargo, el número de células secretoras de anticuerpos parece aumentar con la edad, especialmente las CD5+, que generan autoanticuerpos (Weksler, 2000). También, se ha descrito un aumento de los linfocitos B memoria



(CD27+) y un descenso de los vírgenes (CD27-) en sangre periférica de ancianos. CD27 es un marcador implicado en los procesos de diferenciación de las células B hacia célula plasmática. Así, al tener menos células B vírgenes, la respuesta de los individuos viejos frente a nuevos antígenos estará disminuida (Colonna-Romano *et al.*, 2003, 2006).

En lo que respecta a los fagocitos, éstos o bien no experimentan modificaciones en número como sucede con los monocitos con la edad (Ahluwalia *et al.*, 2001), o disminuyen, como también se ha indicado para los neutrófilos (Schröder y Rink, 2003). Por su parte, en macrófagos se han descrito menos trabajos, pese a ello, se ha comprobado que en cultivos *in vitro*, el número de estas células no varía entre animales adultos y viejos. A pesar de estos hallazgos, la expresión de moléculas de histocompatibilidad tipo II es menor en macrófagos de ratones viejos tras la estimulación con IFN $\gamma$  (Herrero *et al.*, 2002). No obstante, habría que tener en cuenta el tejido en que se encuentran estas células para tener presente un consenso adecuado para futuras investigaciones sobre el número de las mismas (Brubaker *et al.*, 2011). En lo que respecta a macrófagos peritoneales (CD11b+), nuestro grupo de investigación ha arrojado resultados que demuestran una disminución de estas células con la edad, lo que se ha atribuido al aumento en la capacidad de adherencia de estas células a los tejidos peritoneales (Puerto *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2010).

En cuanto a las células natural killer (NK), también experimentan cambios con la edad. Diversos autores han detectado un aumento de las mismas con la edad (Solana *et al.*, 1999, 2014; Camous *et al.*, 2012). Donde los subtipos de CD56<sup>bright</sup> disminuyen, mientras que el subtipo CD56<sup>dim</sup> aumenta en individuos viejos sanos. Asimismo, la expresión del marcador CD57+, aumenta con el envejecimiento; esto

soporta el incremento gradual de células CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>+</sup> al envejecer (Gayoso *et al.*, 2011). Cabe destacar que existen otras poblaciones de células NK, como las NKT que coexpresan el receptor antígeno-específico de los linfocitos T (TCR), y que se encuentran aumentadas en número con la edad (Solana y Mariani, 2000).

En otra línea de ideas, los cambios funcionales en las células inmunitarias con el envejecimiento son más relevantes, como ya se ha indicado, los linfocitos T han sido los más estudiados en este sentido. La función más apreciable de los mismos, es su proliferación o expansión clonal en respuesta a un antígeno. Hay investigaciones que señalan que la capacidad proliferativa basal en ausencia de estímulo puede aumentar, sin embargo frente a un antígeno o mitógenos disminuye claramente al envejecer, hecho que se ha comprobado en el ser humano y animales de experimentación (De la Fuente, 2009a; Arranz *et al.*, 2008, 2010a). Se ha considerado que este deterioro de la linfoproliferación durante el envejecimiento, es específico de las células T vírgenes y que no se ha observado en las células T de memoria (Adolfson *et al.*, 2001), se correlaciona también con la disminución en la secreción de IL-2, junto con un alto porcentaje de linfocitos CD8<sup>+</sup>, que se ha considerado como marcadores predictivos de mortalidad (Pawelec *et al.*, 1995; Fergunson *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha sugerido que la repetitiva estimulación de las células T por una gran variedad de patógenos con la edad, induce a cambios en sus mecanismos de homeostasis normal a un estado de carácter refractario, que podría causar la expresión de genes aberrantes (familia KIR), proteínas citotóxicas (perforina) y sobreexpresión de CD70, LFA-1 e INF $\gamma$  por parte de estas células, lo que conllevaría a ser blancos de apoptosis especialmente las células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, que su vez se vería reflejado en la alteración de la proliferación (Moro-Garcia *et al.*, 2012).

En línea con la apoptosis, diversos estudios se ha observado que la expresión de CD95 en células T aumenta con la edad (Aggarwal y Gupta, 1998; Pawelec *et al.*, 1999; Schindowski *et al.*, 2000), lo que se ha correlacionado con una susceptibilidad de sufrir apoptosis, también se ha asociado que esta mayor susceptibilidad, es debido al aumentado estrés oxidativo intracelular en la vejez (Schindowski *et al.*, 2000). Sin embargo, otros autores consideran que CD95 no es un buen marcador de susceptibilidad frente a la apoptosis ya que en células CD8+ resistentes a la apoptosis, su expresión está aumentada (Effros y Pawelec, 1997; Spaulding *et al.*, 1999). Otros mediadores como las caspasas, se correlacionan mejor con la sensibilidad a procesos apoptóticos. Se ha observado que las actividades caspasa 3 y 8, tanto constitutivas como inducidas por CD95, están aumentadas en células de individuos viejos y disminuidas en los linfocitos T CD8+ (Aggarwal y Gupta, 1999; Spaulding *et al.*, 1999). Otro de los factores que influye en la apoptosis es el perfil de producción de citoquinas de la célula T, aunque no existen conclusiones claras al respecto, se sugiere que el perfil Th2 confiere cierta resistencia frente a la apoptosis inducida por CD95, aunque esto no se ha observado en otras formas de muerte celular programada (Varadhachary *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Además, las células T CD8+ con susceptibilidad disminuida a la apoptosis presentan un perfil tipo Th1 (Solana y Pawelec, 1998).

Es importante indicar que los linfocitos deben migrar hasta el foco infeccioso como paso previo a la linfoproliferación, este tráfico linfocitario está mediado por las interacciones secuenciales entre distintas moléculas de adhesión de los linfocitos y el endotelio (Butcher y Picker, 1996; Casacales, 1999; Campbell y Butcher, 2000). Se ha observado, que las moléculas de adhesión aumentan con la edad. Así, el grupo de Martinis (2000), han comprobado que los linfocitos T de

individuos viejos sobre-expresan las moléculas de adhesión CD49d, CD50 y CD62L, si bien, el número de células que lo hacen es menor que en los individuos adultos. Consecuentemente, la adherencia de los linfocitos de sangre periférica en humano y de los procedentes de peritoneo de ratón es mayor en individuos de edades avanzadas que en adultos. Este hecho también sucede en las células de ratones que presentan un envejecimiento prematuro con respecto a sus controles de edad (De la Fuente *et al.*, 2008; De la Fuente, 2008a, 2008b).

En lo que respecta a la quimiotaxis, es una función poco estudiada en linfocitos considerando que las quimioquinas que participan implicadas en el tráfico linfocitario (IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ), se ha comprobado que los linfocitos T de individuos viejos producen mayores cantidades de MIP-1 $\alpha$ , IL-8 y RANTES tras ser estimulados con anti-CD3 que los de jóvenes, sin embargo, la expresión de los receptores (CCR1, CCR3 y CCR5) para estas citoquinas está disminuida (Middleton *et al.*, 1997; Mariani *et al.*, 2001, 2002). Por otra parte, en trabajos previos de nuestro grupo hemos podido comprobar que los linfocitos de ratones viejos procedentes de órganos inmunocompetentes, presentan una mayor capacidad migratoria que los de los animales adultos (Medina *et al.*, 1998), mientras que la quimiotaxis de linfocitos peritoneales de ratón o de sangre periférica en humanos de edades avanzadas se encuentran disminuidas (De la Fuente *et al.*, 2008; De la Fuente, 2008a, 2008b). También, la quimiotaxis de linfocitos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos se encuentra disminuida con respecto a sus controles de edad (Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente, 2008a, 2008b; De la Fuente, 2009a; Arranz *et al.*, 2010a; Huang *et al.*, 2011).

Los estudios llevados a cabo en relación con los cambios funcionales de los *linfocitos B* con la edad son más limitados que los existentes para las células T. No

obstante, se sabe que las células B sufren toda una serie de alteraciones con el envejecimiento, que se deben en parte a una deficiente cooperación por parte de los linfocitos T (Weksler, 2000; Malaguarnera *et al.*, 2001). La manifestación más clara de las alteraciones que se producen en la inmunidad humoral en ancianos es la deficiente generación de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación (Ben-Yehuda y Weksler, 1992; Palma *et al.*, 2014). También se ha observado que la respuesta antigénica frente a antígenos extraños está reducida en los individuos viejos, sin embargo, la proporción de células secretoras de anticuerpos es mayor que en los individuos más jóvenes (Weksler, 2000). La capacidad proliferativa de los linfocitos B, como sucede con los T está disminuida, además se ha comprobado que la respuesta proliferativa frente a lipopolisacáridos bacteriano (LPS), anti-IgM o anti-CD40 de células B esplénicas de ratones viejos, es significativamente menos que la de animales jóvenes (Frasca *et al.*, 2003). Esto puede deberse a la reducción de células B CD27- con la edad (Colonna-Romano *et al.*, 2003), probablemente por la disminución en la generación de células B de memoria o una deteriorada extravasación de la medula ósea de estas células (Nuñez *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2003).

Las alteraciones funcionales en cuanto a las células NK asociadas con la edad (Albright *et al.*, 2004) pueden contribuir a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y especialmente, neoplásicas (Ginaldi *et al.*, 2001, Tarazona *et al.*, 2002). Curiosamente, a pesar del aumento en el número de células NK que se observa con el envejecimiento no se ha encontrado una mayor actividad citotóxica en individuos anciano. Efectivamente, teniendo en cuenta la actividad citotóxica por célula, ésta disminuye claramente con el envejecimiento (Cossarizza

*et al.*, 1997; Ferrandez *et al.*, 1999; Solana y Mariani, 2000; Puerto *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2008, 2010a; Maté, 2015).

Las células NK dependen en gran medida por la acción de varias citoquinas, entre las que destaca la IL-2, en respuesta a la cual estas células son capaces de incrementar su capacidad citotóxica, proliferar, producir y liberar diversas citoquinas (Solana *et al.*, 1999) como el INF $\gamma$  o el TNF $\alpha$  y las quimioquinas como IL-8, RANTES o MIP-1 $\alpha$  (Mariani *et al.*, 2002a). La disminución en los niveles de IL-2 con el envejecimiento, como se comentará posteriormente, podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de valorar las alteraciones que sufren las células NK con el paso del tiempo. También, la disminución con la edad de la producción de IL-8 e IL-12 parece estar asociada de forma predominante con la función de las células NK (Di Lorenzo *et al.*, 1999, Mariani *et al.*, 2001). En relación con la actividad citotóxica, se ha podido comprobar que tanto la IL-2 como el IFN- $\alpha$  y  $\gamma$ , son capaces de inducir actividad citotóxica frente a células K562 en animales viejos (Krishnaraj, 1992, 1997), pero este efecto desaparece cuando la célula diana pertenece a una línea celular más resistente (Kutza y Murasko, 1994).

En cuanto a las células fagocíticas como los macrófagos tisulares, los monocitos y neutrófilos polimorfonucleares circulantes en sangre, llevan a cabo su función de defensa innata, que se inicia con la adherencia a los tejidos, para posteriormente migrar hacia el foco infeccioso en el que efectúan la ingestión o fagocitosis del agente extraño para posteriormente digerirlo y destruirlo. Estas etapas constituyen lo que se conoce como proceso fagocítico. En la etapa de destrucción del agente infeccioso se generan oxidantes, es lo que se denomina “*estallido respiratorio*”. Tras el procesamiento del material extraño, los fagocitos pueden presentar los determinantes antigénicos a los linfocitos y además producir

una serie de citoquinas que a su vez regulan la función inmunológica. De este modo se establece la relación entre la inmunidad innata y la adquirida o específica (Herrero *et al.*, 2002; Plowden *et al.*, 2004).

En relación a los macrófagos peritoneales, se han observado cambios en la mayoría de sus funciones. Así, se ha descrito una disminución de la quimiotaxis y la fagocitosis con el envejecimiento. Estas modificaciones y también en modelos murinos de envejecimiento prematuro, en los que el deterioro de la funcionalidad de estas células se ha relacionado específicamente con la muerte temprana de los individuos (Guayerbas *et al.*, 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente, 2008a, 2008b). En lo que respecta a la adherencia de estas células si el grupo de Ortega (2000a, 2000b) no observó cambios con la edad. Otros estudios indican un aumento (De la Fuente *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2001; Tsukamoto y Machida, 2012). La producción de anión superóxido, se ha visto que puede aumentar (Ortega *et al.*, 2000a, 2000b) o disminuir (De la Fuente *et al.*, 2000, 2001; Maté, 2015) o en los ratones prematuramente envejecidos (Álvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006).

En células polimorfonucleares de sangre periférica, se ha observado una mayor adherencia, menor quimiotaxis y capacidad fagocítica, y alteraciones en la capacidad microbicida con la edad (Mohacsi *et al.*, 1992; Malaguarnera *et al.*, 2001). Se ha comprobado que la *capacidad de adhesión* a fibronectina y laminina de estas células es ligeramente mayor en los individuos viejos, si bien, tras estimular los neutrófilos con PMA (forbol miristato acetato), fMLP (péptido formilado), GM-CSF o TNF- $\alpha$ , estas diferencias desaparecen (Tortorella *et al.*, 2000). Nuestro grupo también ha podido comprobar una mayor adherencia de los neutrófilos de sangre periférica en individuos de edades avanzadas (Alonso-

Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008). Además, en el envejecimiento se ha descrito una menor capacidad migratoria o *quimiotaxis* (Izgüt-Uysal *et al.*, 2003; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008) y *fagocitosis* de los neutrófilos (Wenish *et al.*, 2000; Butcher *et al.*, 2001; Izgüt-Uysal *et al.*, 2003; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008). Algunos autores han indicado que el reclutamiento de los neutrófilos hacia el foco infeccioso está preservado en la vejez (Esparza *et al.*, 1996; Lord *et al.*, 2001) o incluso aumentado (Wenish *et al.*, 2000), pero una vez en el dicho foco, el principal fallo de los neutrófilos sería su reducida capacidad fagocítica (Lord *et al.*, 2001).

En lo que respecta a los cambios en la producción y secreción de citoquinas con la edad. Una de la más estudiada y con gran repercusión en los procesos de linfoproliferación, es la interleuquina 2 (IL-2). Muchos autores coinciden en señalar que la liberación al medio de esta citoquina disminuye con la edad (Makinodan, 1998; Globerson y Effros, 2000; Medina *et al.*, 2000; Pawelec *et al.*, 2002; De la Fuente, 2002, 2003; De la Fuente, 2009a; Arranz *et al.*, 2010c; Maté, 2015). En otras citoquinas, los resultados son más controvertidos, observándose en la vejez aumentos, disminuciones o niveles similares a los adultos, suceso descrito por ejemplo en el caso del INF- $\gamma$  (Ckaman *et al.*, 1996; Weyand *et al.*, 1998, Globerson y Effros, 2000). Así también, citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-10 y IL-8, que según algunos estudios parecen aumentar con la vejez (Ckaman *et al.*, 1996; Mariani *et al.*, 2001), en otras investigaciones se han observado ninguna modificación de sus niveles (Candore *et al.*, 1993; Kirman *et al.*, 1996).

Lo que parece ocurrir al envejecer es un cambio en el perfil de Th1/Th2 con la edad, dándose una disminución de las Th1 (IL-2, IFN $\gamma$ , IL-12) que median la respuesta celular y un aumento de las citoquinas del grupo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6)



que actúan en la respuesta de humoral (Mossman y Sad, 1996; Shearer, 1997; Alberti *et al.*, 2006). No obstante, no todas las investigaciones han observado un unánime cambio en el patrón de citoquinas hacia Th2 (Castle *et al.*, 1999; Karanfilov *et al.*, 1999), sugiriendo que la alteración de la red de interacciones de citoquinas es algo más complicado que un simple cambio unidireccional. En general, se puede decir que al envejecer se incrementen las citoquinas pro-inflamatorias (como TNF $\alpha$  o la IL-6) y disminuyen las anti-inflamatorias como la IL-10 (Pawelec *et al.*, 2002, De la Fuente *et al.*, 2005; Mariani *et al.*, 2006; Kaszubowska *et al.*, 2011; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012). Por otro lado, es relevante tener en cuenta que los perfiles de citoquinas como la IL-6, IL-10 o IL-15 se ha asociado con una mayor longevidad (Caruso *et al.*, 2004; Gangemi *et al.*, 2005).

### **1.3. La comunicación neuroinmunoendocrina y sus cambios con el envejecimiento**

#### **1.3.1. La comunicación neuroinmunoendocrina**

El sistema inmunológico no trabaja aisladamente de los otros sistemas reguladores (sistema nervioso y endocrino) para conseguir el mantenimiento de la homeostasis del organismo, y consecuentemente la salud del mismo, lo hace una estrecha conexión bidireccional (Figura 3). Esta comunicación neuroendocrina ya fue propuesta en los trabajos del grupo de Besedovsky y colaboradores, de los años setenta, al observar como los niveles de glucocorticoides se elevaban durante la respuesta inmunológica produciendo un efecto supresor sobre la misma (Besedovsky, 1971; Besedovsky *et al.*, 1977; Besedovsky y Del Rey, 2006). Posteriormente, éstos y otros investigadores confirmaron esa conexión

(Besedovsky y Del Rey, 1996; Ader *et al.*, 2001; Blalock, 2005; Basedovsky y Del Rey, 2007; Basedovsky y Del Rey, 2011; Del Rey *et al.*, 2012). Siguiendo las sugerencias de Blalock (1989), el sistema inmunológico se puede considerar como el receptor de los estímulos *no cognoscitivos*, es decir, de las infecciones, células malignizadas o extrañas, que aparecen en el organismo. Al responder a las mismas con la liberación de citoquinas que llegan al sistema nervioso y endocrino informándoles de la presencia de tales estímulos. Por su parte el sistema neuroendocrino es el receptor de los estímulos *cognitivos*, como la luz, sonido situación del estrés, a los que responden sus mediadores (neurotransmisores y hormonas) que, además de sus papeles preparando al organismo para tales estímulos, llevan la información al sistema inmunológico. De hecho, actualmente se ha comprobado que las células de los tres sistemas comparten receptores para mediadores típicos de otros y que pueden sintetizar dichos mediadores celulares. Así, que cualquier incidencia que ocurra en cualquiera de estos sistemas repercutirá de forma conjunta en todos los demás (Ader *et al.*, 2001). De este modo, poseemos un sistema *Neuroinmunoendocrino* que permiten en mantenimiento de la homeostasis corporal, y por consiguiente, de salud del individuo (Arteaga *et al.*, 2002; De la Fuente, 2014).

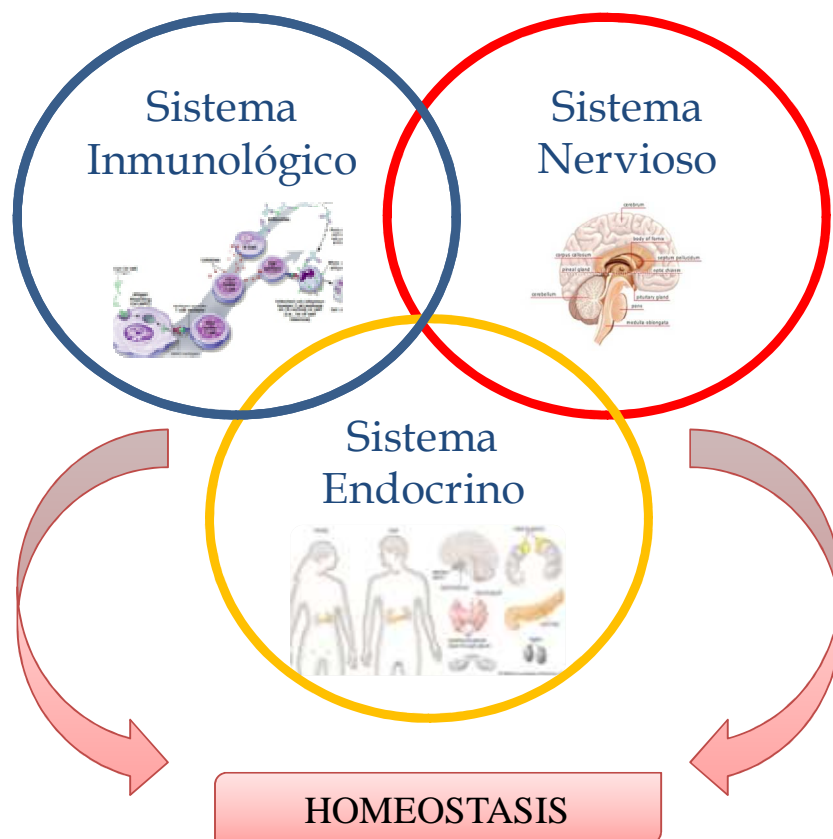
La capacidad del sistema nervioso (SN) de modular la respuesta inmunitaria, hecho ampliamente demostrado (Ader, 2000; Yang y Glaser, 2002; Blalock, 2005; Espinosa-Oliva *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2014), es mediada por la innervación que los órganos linfoides, ya sean primarios ó secundarios, que reciben del SN periférico (Felten *et al.*, 1992). La importancia de dicha innervación no sólo se ve reflejada por el hecho de que las lesiones en el SN provocan alteraciones en el Sistema Inmunológico (SI) (Roszman *et al.*, 1985), sino también, porque se ha

postulado que el desarrollo óptimo de los órganos linfoides depende, al menos en parte, de la presencia local de neurotransmisores (Ackerman *et al.*, 1987; Bulloch *et al.*, 1987). Recientemente, se ha señalado que el estrés psicológico es capaz de regular la respuesta inmunológica celular, provocando alteraciones en los procesos de reparación de los tejidos y un incremento de la susceptibilidad frente a infecciones (Yang y Glaser., 2002).

Igualmente, también los mediadores del sistema endocrino (SE) pueden ejercer sus efectos sobre el SI, dado que los órganos inmunológicos están irrigados y que además los leucocitos circulan por sangre. De esta manera, hoy se acepta la idea de que distintas hormonas pueden alcanzar a las células inmunitarias y modificar su funcionalidad, puesto que poseen receptores específicos para ellas (Kaschka, 1997). Es importante destacar que la producción de las hormonas sexuales por parte del SE, y la compleja red de interacciones neuro-inmuno-endocrinas diferirá entre hombres y mujeres, siendo así el factor género un contribuyente clave en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Bale, 2009; Pitychoutis y Papadopoulou-Daifoti, 2010). En línea con ello, el dimorfismo sexual de los sistemas reguladores, tendrían como base la influencia de las hormonas sexuales, razón por la que se encuentran descritas numerosas enfermedades que afectan diferencialmente a hombres y mujeres en términos de incidencia, susceptibilidad y progresión (O'Brien *et al.*, 2007; Butts y Sternberg, 2008; Giménez-Llort *et al.*, 2012).

Por su parte, el SI puede modificar el funcionamiento del SN y el SE, dado que las citoquinas producidas en respuesta al reto antigénico, alcanzan el cerebro y los órganos endocrinos, induciendo profundos cambios en la actividad de los mismos y de los ejes neuroendocrinos (Basedovsky *et al.*, 1977; Basedovsky y Del Rey,

1987; Blalock, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005; Besedovsky y Del Rey, 2007; Gadek-Michalska *et al.*, 2013; Kurowska y Majkutewicz, 2015).



**Figura 3.** Comunicación Neuroinmunoendocrina. (De la Fuente y Miquel, 2009).

Tras estudios de investigación sobre la interacción neuroinmunoendocrina y la confirmación científica de los mismos, han permitido comprender por qué situaciones de depresión, estrés emocional o la ansiedad, conllevan a una mayor susceptibilidad a infecciones, cánceres o enfermedades autoinmunes, reflejando una alteración del SI, que a su vez terminaría en un deterioro de la salud y una menor longevidad. En contraste, situaciones con visión optimista de la vida, y realizar ejercicio físico como efecto positivo, ayudaría al descenso de la depresión y la ansiedad, una mejor tolerancia al estrés y una mejora de la autoestima, que al final se ve recompensado con el mantenimiento de una buena función inmunológica,

reflejada en una buena homeostasis de todos los sistemas reguladores (SE, SI y SN) (Brannon y Feist, 1992; Arranz *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2009; Cruces *et al.*, 2014a).

### **1.3.2. Cambios en la comunicación neuroinmunoendocrina con el envejecimiento**

A lo largo del proceso de envejecimiento los sistemas homeotáticos sufren una serie de modificaciones en cada uno de ellos y en su comunicación. Lo que explica el deterioro progresivo y sistemático de la homeostasis corporal al envejecer, y el consecuente aumento de la morbilidad y mortalidad (Straub *et al.*, 2000; 2001; Collaziol *et al.*, 2004; Cruces *et al.*, 2014a; De la Fuente, 2014). La manifestación más clara de este deterioro tiene lugar en las circunstancias de tener que responder frente a una situación de estrés, tanto de carácter físico como psicológico (Naliboff *et al.*, 1991; Pedersen *et al.*, 2000; Weinert y Timiras, 2003).

El SE y SN forman un círculo integrado de información en el que se comparten ligandos y receptores junto con el SI. De este modo, se ha comprobado que las células inmunitarias son capaces de sintetizar neurotransmisores y hormonas como, por ejemplo, la hormona adenocorticotropa (ACTH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona del crecimiento (GH), entre otras (Blalock., 1989). A pesar de la poca cantidad de estas sustancias que produce el SI, su efecto es paracrino o autocrino, pero no por ello es menos destacable, ya que permite completar la regulación y comunicación entre los tres sistemas (Gaillard, 1994; Savino *et al.*, 1995). Gracias al sistema de recirculación de las células inmunitarias, favorecen la comunicación desde el torrente sanguíneo a los tejidos y de éstos al

sistema linfático. Esto hace posible el contacto de las células del SI con productos derivados de los otros sistemas (De la Fuente *et al.*, 2011; De la Fuente, 2014). Dando como resultado que los sistemas reguladores se encuentren anatómicamente y funcionalmente interconectados entre ellos (Blalock *et al.*, 1985; Blalock, 1989; 1994; Besedovsky y del Rey, 1996; 2001).

Por ejemplo el SE, durante el envejecimiento no escapa a variaciones es la secreción de hormonas que disminuye con la edad, como la hormona de crecimiento (GH), su reducción progresiva conduce a cambios en la composición corporal (pérdida de la masa y fuerza muscular, incremento del tejido adiposo) (Binnerts *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2000) y provocaría efectos importantes sobre el SN (López-Fernández *et al.*, 1996; Nyberg F, 2000; Carro *et al.*, 2001; Trejo *et al.*, 2004). Conjuntamente, son múltiples los efectos moduladores de las hormonas sexuales sobre las células inmunitarias, como es el caso de los estrógenos que potencian la inmunidad humoral, mientras que los andrógenos y la progesterona actúan como inmunosupresores naturales. Además, el estradiol inhibe la expresión génica y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación del NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2012). Además, la funcionalidad de sistema inmunitario varía, con el ciclo menstrual, hecho observado en los niveles citoquinas (O'Brien *et al.*, 2007; Dennison *et al.*, 2012). Por ejemplo, con la menopausia, se aumentan las citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, lo que implica una conexión molecular entre la pérdida de los esteroides sexuales y la inmunosenescencia. Así, la mayoría de estudios existentes concluyen que la menopausia posee un papel adicional al envejecimiento del sistema inmunitario (Vrachnis *et al.*, 2014). Por otro lado se ha observado, que la melatonina disminuye con el envejecimiento, y provoca un incremento de la tasa de producción de radicales libres, y un descenso

de la actividad de las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), y la glutatión peroxidasa (GPx), y actúa como depresor del sistema nervioso central (SNC) (inhibiendo la neurotransmisión glutamatérgica y estimulando la GABAérgica) (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2004; Ariznavarreta *et al.*, 2009).

En lo que respecta a los cambios acontecidos en el SN, son de carácter dinámico empezando por la disminución del volumen cerebral, un aumento de los ventrículos y del líquido cefalorraquídeo y una reducción de la sustancia blanca por la mielina (Peinado *et al.*, 2009). Otras de las consecuencias más relevantes como resultado del envejecimiento, es el deterioro de los circuitos mediados por los neurotransmisores, como los colinérgicos (acetilcolina), debido a la disminución en la colina acetiltransferasa (enzima de síntesis de acetilcolina), principalmente en el hipocampo y corteza cerebral, sumado a una reducción en la densidad de los receptores muscarínicos en otras áreas distintas cerebrales, como el caudado, putamen y corteza frontal (Dewey *et al.*, 1990; Sarter *et al.*, 1998). Así mismo, los sistemas dopaminérgicos, sufren alteraciones cognitivas y motoras que se observan en individuos de edad avanzada (Robbins *et al.*, 2000). También, hay pérdida de neuronas dopaminérgicas localizadas en el mesencéfalo y disminución de la tiroxina hidrosilasa (enzima de síntesis de dopaminérgica) (Barili *et al.*, 1998), y una disminución en la liberación de dopamina (Zelnik *et al.*, 1986; Morelli *et al.*, 1990). También los neurotransmisores noradrenérgicos (noradrenalina) se ven afectados, con una pérdida de neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus* y una disminución de las concentraciones de noradrenalina y de la densidad de receptores adrenérgicos en regiones específicas del cerebro con la edad (Wenk *et al.*, 1989; Arnsten *et al.*, 1985; Manaye *et al.*, 1995). Con respecto a los cambios del

sistema serotoninérgicos (serotonina), se ha descrito pérdida de la densidad axónica y en la morfología de los axones con proyecciones serotoninérgicas (Nishimura *et al.*, 1998), así como, una disminución en la concentración de serotonina en su liberación y en la densidad de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en corteza e hipocampo en diversos estudios experimentales en humanos y animales (Nobler *et al.*, 1998).

Además, con el envejecimiento se experimenta una pérdida funcional de las neuronas y la microglia, que conllevaría a un daño oxidativo y a un estado crónico inflamatorio en el cerebro (activación prolongada de la microglia), incrementándose la susceptibilidad a la neurodegeneración (Aloisi, 2001; Gemma *et al.*, 2010). Esta prologanda disfunción esta relacionada con la producción de citoquinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 y una disminución de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 o TGF- $\beta$ 1 (Floyd *et al.*, 1999; Gemma *et al.*, 2007; Sparkman *et al.*, 2008; Gemma *et al.*, 2010; Gemma, 2010; Gadek-Michalska *et al.*, 2013; Kurowska y Majkutewicz, 2015). Por ejemplo, IL-6, podría contribuir en el deterioro cognitivo y pérdida de memoria asociado con la edad (Gemma *et al.*, 2010), o la IL-10 que muestra propiedades inmunosupresoras, que podría contribuir en la neuroprotección y neurogénesis en animales con trastornos neurodegenerativos, regulando la respuesta al estrés y a la plasticidad sináptica con el aprendizaje y la memoria (Kurowska y Majkutewicz, 2015). Además, las citoquinas pro-inflamatorias (especialmente IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ), son elementos importantes en los procesos de señalización en el cerebro durante una infección (Besedovsky, 1996; Maier *et al.*, 2001). Además, están concretamente implicadas en procesos de dolor crónico o neuropático puesto que la lesión en un nervio atrae y activa a las células del sistema inmunitario y a las células gliales,



exacerbando ese dolor (Milligan *et al.*, 2001, 2003). También se ha observado que estas citoquinas pro-inflamatorias regulan la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), y que parece que su efecto predominante es activar dicho eje y suprimir el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y el hipotálamo-hipófisis-gónadas, así como la liberación de GH (Turnbull y Rivier., 1999; Bumiller *et al.*, 1999). El efecto modulador sobre el sistema neuroendocrino de estas citoquinas, ya que este sistema posee receptores para dichas sustancias, pudiendo éstas regular la acción y secreción de varias hormonas y neurotransmisores e incluso modificar procesos emotivos, cognitivos y sensoriales (Maier *et al.*, 2003).

#### **1.4. El estrés oxidativo y el sistema inmunitario. Papel del envejecimiento**

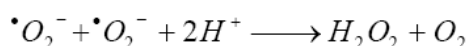
##### **1.4.1. El estrés oxidativo**

Se define *estrés oxidativo* al entorno en que las células están expuestas a un ambiente oxidante que ha evadido los mecanismos de defensa antioxidante llegándose a un desequilibrio del balance oxidantes/antioxidantes favoreciendo a los primeros, afectando el estado redox del organismo (Sies, 1986). El estrés oxidativo resulta de un aumento en la producción de precursores de radicales de oxígeno, incrementando así las especies reactivas de oxígeno (ROS). Especies que presentan una alta reactividad tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares. Se conoce que sus blancos fundamentales son los ácidos grasos insaturados de las membranas fosfolípicas, proteínas y ácidos nucleicos. Una vez formadas generan una serie de reacciones en cadena (peroxidación lípida, glicosilación) que pueden dañar todas las moléculas de importancia biológica ya sea por una alteración directa de la estructura y función, por la aceleración de la proteólisis o por el incremento de la función enzimática

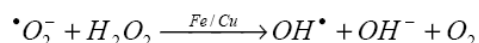
(Zorrilla, 1999). Cabe destacar que dependiendo de la cantidad, localización y duración del daño oxidativo causado por las ROS, pueden ejercer daños o regulación de las cascadas de señalización celular (Brieger *et al.*, 2012). Una molécula de oxígeno en estado basal puede considerarse un radical libre al tener dos electrones desapareados de espines paralelos. Esto le confiere un fuerte carácter oxidante pero le obliga a aceptar los electrones de uno en uno (Halliwell y Gutteridge, 1984), dando lugar a una serie de especies reactivas que incluyen: el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) o el oxígeno en estado singlete ( $^1O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ), productos del metabolismo normal (Halliwell y Gutteridge, 1984, Chance *et al.*, 1979; Cadenas, 1989; Vida *et al.*, 2014). Generalmente se utiliza el término “especies reactivas de oxígeno” abreviadamente denominadas ROS (del inglés: “*reactive oxygen species*”). Esta denominación incluye tanto a los compuestos que se acogen a la definición de radical libre como aquellos grupos funcionales con oxígeno químicamente reactivo con una reactividad y vida media muy corta de  $10^{-5}$  a  $10^{-9}$  seg (Pryor, 1986; Víctor *et al.*, 2005).

Se puede definir como “*radical libre*” a cualquier molécula que es capaz de existir independientemente, y que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales más externos (Fridovich, 1978). Los radicales pueden reaccionar con otras moléculas a través de varias vías: 1) por la ruptura homolítica del enlace covalente de una molécula, 2) por la pérdida de electrón, y 3) por la adición de un electrón. Si dos radicales se encuentran pueden combinar sus electrones no apareados y unirse covalentemente (Armstrong *et al.*, 1984; Pryor 1986; Cadenas, 1989).

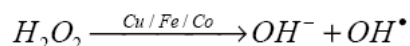
El *radical superóxido* se forma por adición de un electrón extra a una molécula de oxígeno. En estas vías metabólicas están implicadas enzimas como la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, la triptófano dioxigenasa, las flavín deshidrogenasas y las peroxidasas (Halliwell, 1987). También puede generarse por la autooxidación de varias moléculas biológicamente importantes, como son el gliceraldehído, los compuestos tiólicos como la cisteína, las catecolaminas, las formas reducidas de la riboflavina y sus derivados FMN y FAD (Del Maestro, 1980). El radical superóxido es capaz de reaccionar consigo mismo, en una reacción de dismutación:



Como carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas, se ha llegado a proponer para él un papel de mensajero (Saran y Bors, 1990). Sin embargo la enzima superóxido dismutasa, presente en multitud de organismos, elimina el radical superóxido catalizando la reacción anterior. Es esta transformación la que potencia su toxicidad ya que el radical superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno en presencia de hierro o cobre dando lugar al muy reactivo radical hidroxilo a través de la reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1934):



El *peróxido de hidrógeno* puro puede inactivar enzimas directamente, como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, oxidando grupos tiólicos, llevando a la célula a una deficiencia de ATP por inhibición de la glicolisis. En presencia de trazas metálicas (Cu, Fe, Co) se produce la reacción de Fenton (Fenton, 1894; Walling, 1982), dando lugar al radical hidroxilo a partir de  $H_2O_2$ :



El *radical hidroxilo*, es el radical libre más reactivo que se conoce y es capaz de dañar a la mayoría de las moléculas que forman parte de las células (Halliwell y Gutteride, 1984). Es altamente reactivo que su existencia es de pocos microsegundos y se combina rápidamente con moléculas vecinas, comenzando una serie de reacciones en cadena que pueden atacar al DNA provocando mutaciones. El daño biológico causado por  $OH^\bullet$  mejor caracterizado es la peroxidación lipídica (Aruoma *et al.*, 1989).

El *oxígeno singlete*, posee una configuración electrónica de alta energía. Su vida media de esta especie es corta, sobre todo en solución acuosa, pues pierde rápidamente su energía, pero tiene capacidad para sustraer un hidrogenión ( $H^+$ ) de un ácido graso insaturado iniciando así la reacción de peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteride, 1989).

Las ROS pueden desencadenar efectos beneficiosos si su producción es limitada, o por el contrario, pueden ser nocivos si su producción es excesiva, como sucede en el caso del shock endotóxico y otras patologías (Bosmann y Ward, 2013). Además, pueden reaccionar con proteínas intracelulares, con el ADN, con componentes lipídicos de las membranas celulares, participan en la transducción de señales intracelulares (Blake *et al.* 1987, Harman 1992, Pryor 1986, Southorn y

Powis 1988, Webster y Nunn 1988), y también juegan un papel primordial en un gran número de células inmunitarias (células T citotóxicas, NK, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células polimorfonucleares PMN), las cuales tienen una intervención activamente en la destrucción de los microorganismos (Víctor *et al.*, 2004).

Encontramos numerosos sitios de generación de ROS, agrupándose las fuentes en: A) *endógenas* (producidas por el propio organismo, como la cadena respiratoria mitocondrial y los leucocitos activados) y B) *exógenas* (medioambientales: radiaciones y contaminantes) (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994).

A) *Fuentes endógenas*: Una de las fuentes más importantes a nivel subcelular de especies reactivas de oxígeno como el  $O_2^{\cdot-}$ , es la cadena de transporte de electrones, situada en la mitocondria (orgánulo que se encuentra presente en todas las células aeróbicas) (Cino y Del Maestro, 1989). La cantidad de  $O_2^{\cdot-}$  producido en la mitocondria se ve incrementada cuando la concentración de oxígeno aumenta o la cadena respiratoria se encuentra en su mayor parte reducida (McCord, 1993). Se estima que entre un 1-2% del oxígeno consumido por la mitocondria es transformado en especies reactivas. Otras fuentes generadoras de radicales libres tenemos: la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos a nivel de los peroxisomas (Ohikawa y Novikoff, 1995), el citocromo P-450 del retículo endoplasmático, que son capaces de metabolizar compuestos xenobióticos y la detoxificación de dosis agudas de toxinas, lo que genera la aparición de  $O_2^{\cdot-}$  (Ames *et al.*, 1993). Además, determinadas enzimas presentes en el citosol producen también  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ , como la *xantina oxidasa* responsable del metabolismo de las purinas, que cataliza la conversión de la hipoxantina en xantina y finalmente en

ácido úrico y juega un papel primordial en enfermedades relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo (Borges *et al.*, 2002; Harrison, 2004), y la ciclooxigenasa (implicada en el metabolismo del ácido araquidónico) (Feng *et al.*, 1993).

Por otro lado, las células fagocíticas son uno de los tipos celulares en los que la producción de ROS es una consecuencia clave de la activación y funcionamiento normal de éstas. Y es que células como macrófagos y neutrófilos ejercen una función defensiva eliminando patógenos, para lo cual utilizan una mezcla de ROS, en un proceso conocido como “*estallido respiratorio*”. Por último, hemos de citar el proceso de generación accidental de ROS, incluye las llamadas “*reacciones de autooxidación*”, normalmente catalizadas por iones de metales de transición en las que compuestos como las catecolaminas, el ácido ascórbico y las flavinas reducidas podrían reaccionar con el oxígeno para generar superóxido (McCord y Fridovich, 1969, McCord, 1993; Indo *et al.*, 2014; Phaniendra *et al.*, 2015).

*B) Fuentes exógenas:* nos encontramos con agentes antineoplásicos (como la adrimicina, bleomicina) y algunos antibióticos (Doroshov y Hochstein, 1982), las radiaciones de distintos tipos, electromagnéticas (rayos X y  $\gamma$ ), electrones, protones, neutrones, etc (Bielsky y Gebieki, 1977), y por último factores ambientales como pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y los compuestos halogenados (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2008; Phaniendra *et al.*, 2015).

Las ROS tienen la capacidad de producir acciones oxidativas en las principales macromoléculas biológicas (lípidos, ácidos nucleicos y proteínas).

En los *lípidos*, presente en las membranas actúan causando la peroxidación lipídica, proceso que sucede fundamentalmente en los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), dando lugar a acumulaciones de hidroperóxidos lipídicos en las membranas que alteran su funcionamiento y estructura. Además, estos hidroperóxidos originan a una serie de productos altamente citotóxicos, la mayoría aldehídos, que pueden causar daños a proteínas, actuar como agentes mutagénicos e inactivar receptores de enzimas de membrana (Dean *et al.*, 1986; Esterbauer *et al.*, 1988). Del mismo modo, dicha peroxidación provoca un aumento en la viscosidad de las membranas, una fragmentación de los ácidos grasos (con la consiguiente aparición de productos de degradación como el malondialdehído o MDA) y una disminución de su resistencia eléctrica, facilitándose en consecuencia el intercambio entre las dos monocapas, con lo que aumentan los entrecruzamientos con proteínas y se produce la disminución de la movilidad lateral y rotacional de las mismas (Chen y Yu, 1994). En algunos estudios sobre el daño oxidativo, a nivel de las membranas mitocondriales, se han observado claros aumentos de productos de la oxidación de fosfolípidos como, el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Navarro *et al.*, 2002, 2005) y el hidroperóxido orgánico (ROOH) (Sastre *et al.*, 2003). Otro de los daños que pueden causar los ROS, es el daño peroxidativo a *proteínas*, las principales modificaciones oxidativas que sufren las proteínas incluyen la oxidación de grupos sulfhidrilo, las reacciones con aldehídos, los entrecruzamientos proteína proteína y la fragmentación peptídica (Stadtman y Berlett, 1997; Stadtman y Levine, 2000). Si la proteína dañada es una enzima, generalmente tiene lugar una pérdida de su actividad, convirtiéndola en una forma altamente susceptible de sufrir degradación proteolítica por parte de proteasas citosólicas (Davies, 1987; Davies y Delsignore, 1987; Naudí *et al.*, 2009).

El efecto más deletéreo del ataque de los radicales libres es el daño peroxidativo al ADN, cuyo sistema de reparación es mucho más complicado que el del resto de las macromoléculas, lo que da lugar a la generación de mutaciones y alteraciones genómicas, que modifican sus propiedades codificadoras o su normal replicación y transcripción, dándose deleciones, translocaciones, descenso en las metilaciones, aparición de puentes cruzados entre cadenas de ADN o entre ADN y proteínas, fragmentaciones, roturas simples o dobles de la cadena y modificación de las bases (Box *et al.*, 2001). Una de las bases empleada como un marcador del daño oxidativo al ADN es la guanina (Pisoschi y Pop, 2015).

Por otro lado, en los últimos años se le ha dedicado gran atención a las especies reactivas de nitrógeno RSN (del inglés: "*reactive nitrogen species*"). El óxido nítrico (NO) es una molécula relevante, que se presenta en distintos estados redox: radical NO•, catión nitrosonio NO<sup>+</sup> y anión nitroxilo NO<sup>-</sup> (formado a partir del radical NO por acción de la SOD)(Murphy y Sies, 1991) Tiene distintas funciones, actúa como regulador del flujo sanguíneo local, como anti-gregante plaquetario, su producción por los macrófagos activados contribuye a la defensa inmunitaria primaria, actúa como neuromodulador, segundo mensajero y mediador del neurotransmisor excitador glutamato (Czapski y Goldstei, 1995). La primera diana fisiológica descrita para el NO, es la guanilato ciclasa soluble; este radical se une a ella y la estimula controlando la función celular via GMPc (canales, proteínas quinasas o fosfodiesterasas dependientes de GMPc). También se une a la citocromo c oxidasa, inhibiendo reversiblemente la respiración de forma competitiva con el oxígeno, desenergizando la mitocondria y aumentando la generación de radical superóxido por este orgánulo. Este último mecanismo también parece muy relevante en las acciones fisiológicas y patológicas del NO



(Richter, 1997). Además, posee una acción antiinflamatoria importante pero a la vez promueve la disfunción celular y tisular a través de un efecto pro-inflamatorio (Grisham *et al.*, 1999). Estas múltiples funciones del NO, son consideradas positivas o negativas dependiendo de la situación. Esta dicotomía del NO es debida, en parte, al espectro de especies redox con diferentes propiedades en las que se presenta, y su capacidad para reaccionar con el superóxido de oxígeno para obtener peroxinitritos ONOO<sup>-</sup>. Los *peroxinitritos*, son eficientes oxidantes de los tioles y su producción se ha implicado en la fisiopatología del *shock endotóxico* (Lin *et al.*, 1995). Estos peroxinitritos son capaces de inducir peroxidación lipídica, interferir con la señalización celular mediante la nitración de residuos aromáticos en las proteínas, degradar carbohidratos, nitrar y oxidar la guanosina y fragmentar el ADN (Beckman *et al.*, 1994; Beckman y Koppenol., 1996).

### **Las defensas antioxidantes**

A pesar de que los organismos aerobios sufren una lesiones oxidativas, también tienen la capacidad de respuesta para evitar o inhibir el ataque de las ROS, y eliminar su exceso para la protección de la fisiología celular, y lo hacen a través de los antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2006; Subhashini *et al.*, 2011). Se conocen una serie de antioxidantes, tanto de tipo enzimático como no enzimático, que se han conservado a lo largo de la evolución y contribuyen a mantener la homeostasis redox celular (Halliwell y Gutteridge, 2006).

Dentro de las defensas enzimáticas encontramos aquellas que interaccionan directamente con las ROS como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (Gpx). También se comentará la acción de la glutatión reductasa (GR).

En el caso de la *superóxido dismutasa (SOD)*, descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969, estos autores demostraron que la hemocupreína de eritrocitos era capaz de eliminar el radical superóxido transformado en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Existen diferentes isorformas de SOD en distintos compartimentos celulares: *MnSOD* localizada en la matriz mitocondrial, es una proteína aislada primeramente en *E. coli* cuyo peso molecular es de 40kD. En organismos bacterianos suele tener 2 subunidades. Y en organismos superiores posee 4 subunidades, es mucho más lábil que la *Cu/Zn-SOD* y no es inhibida por cianuro (Weisiger y Fridovich, 1973; Tyler, 1975). *Cu/Zn SOD* localizada en el citosol, y en el espacio entre la membrana interna y externa de la mitocondria, y una forma diferente de *Cu/Zn* en el compartimento extracelular, posee un peso molecular de 32kD con dos subunidades de 153 aminoácidos, cada una de las cuales posee un sitio activo con un átomo de cobre, con actividad catalítica, y otro de zinc, que estabiliza la estructura. Es una enzima muy estable lo que facilita su aislamiento pero es fuertemente inhibida por cianuro, lo que la diferencia del resto de las SOD (Nordberg y Amér, 2001). Y por último, *Fe-SOD*: Similar a la *Mn-SOD*, se encuentra casi exclusivamente en procariotas y algas. Aunque, la SOD tiene la capacidad de eliminar el radical superóxido, no es considerada como un antioxidante completo porque su actividad genera  $H_2O_2$  (Naudí *et al.*, 2009). No obstante, la CAT y Gpx son dos enzimas diferentes pero cinéticamente complementarias para la eliminación del peróxido de hidrógeno.

La *catalasa (CAT)* es una de las enzimas conocidas más activa que cataliza la reacción de descomposición del  $H_2O_2$  para dar  $H_2O$  y  $O_2$ . Es de gran importancia en el metabolismo y eliminación de las ROS (Galeotti *et al.*, 1990; Naudí *et al.*, 2009) La cinética de la catalasa no obedece a un patrón normal, es una enzima no

saturable por sustrato y existe una rápida inactivación a concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por encima de 0,1M (Aebi, 1984). La catalasa tiene un peso molecular que oscila entre 210KD y 280KD y está formada por 4 subunidades proteicas, cada una de las cuales posee un grupo hemo ( $\text{Fe}^{3+}$ -protoporfirina) unido a un sitio activo. Cada subunidad suele contener también una molécula de NADPH unida, que ayuda a estabilizar la enzima (Kirkman *et al.*, 1987). La actividad catalasa en tejidos animales está localizada en los peroxisomas. Sin embargo, muestra baja afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por lo que su eficacia se manifiesta a elevadas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La *glutación peroxidasa (Gpx)* a diferencia de lo indicado para la CAT, son mucho más funcionales a bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya que muestra una alta afinidad pero una baja tasa catalítica. Están constituidas por 4 subunidades de 182 aminoácidos y contiene un átomo de selenio (Se) en el centro activo de cada subunidad. La proteína nativa tiene un peso molecular de 84kD. Fue Mills en 1957 quien descubrió la enzima en los tejidos animales; comparte las mismas localizaciones subcelulares que la SOD. Su sustrato es específicamente el glutatión (GSH) aunque puede utilizar peróxidos orgánicos además de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mills, 1957). El GSH tras la acción de la GPx se transforma en glutatión oxidado (GSSG), agente tóxico para la célula (Deponte, 2013).

La *glutación reductasa (GR)* es la encargada de reducir el GSSG y pasarlo a GSH, gracias a esta enzima la relación GSSG/GSH en células normales se mantiene baja. Además, la GR puede catalizar la reducción de ciertos disulfuros mixtos, tales como los que se forman entre GSH y el coenzima A. Estructuralmente la GR contiene dos subunidades proteicas, cada una con un nucleótido de flavina FAD en su centro activo. El NADPH reduce el FAD, que entonces pasa sus electrones al

puente disulfuro entre dos cisteínas de la proteína. Los dos grupos tiólicos así formados interaccionan entonces con el GSSG y lo reducen a 2GSH (Catalá, 2002; Deponte, 2013).

### **Antioxidantes no enzimáticos**

Aparte de de las enzimas antioxidantes, otros compuestos antioxidantes no enzimáticos endógenos cooperan en el mantenimiento de la homeostasis redox del organismo. Son moléculas de bajo peso molecular lo que les permite eliminar las ROS en lugares donde las enzimas de gran peso molecular no accederían. Uno de estos antioxidantes es el *glutación*, un tripeptido glutación (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) (GSH). Es el un compuesto tiólico de bajo peso molecular de mayor distribución en los sistemas biológicos y el más abundante en las células, siendo niveles intracelulares en mamíferos de 0,5 a 10mM (Meister y Anderson, 1983). Su actividad antioxidante reside en el grupo tiol reducido de su cisteína. Pueden reaccionar directamente con las ROS o puede actuar como co-sustrato en reacciones enzimáticas catalizadas por la glutación peroxidasa (GPx). Constituye la fuente de poder reductor más importante en la célula (Forman y Fisher, 1981).

Otro antioxidante no enzimático frente al oxígeno singlete, radicales peroxilo, radicales hidroxilo, y con capacidad de inhibir la peroxidación lipídica es el *ácido úrico*, sel cual se produce por la descomposición de adenilatos hasta xantina. (Nikki, 1987). No obstante, no es considerado un “perfecto antioxidante”, pues puede formar radicales en su reacción con el radical hidroxilo (Barr, 1990). También encontramos el *ubiquinol* o *coenzima Q*, antioxidante liposoluble único que se sintetiza en el organismo, ejerce funciones antioxidantes a pesar de encontrarse implicado en el metabolismo energético mitocondrial. Su forma

reducida, ubiquinol QH<sub>2</sub>, actúa como un antioxidante natural debido a su intervención en actividades biológicas de transferencia de equivalentes reductores, las cuales reciclan los productos antioxidantes derivados del QH<sub>2</sub> a la forma antioxidante activa (Ernster y Dallner, 1995; Dutton *et al.*, 2000).

### **Antioxidantes exógenos**

Como antioxidantes exógenos se pueden citar, el *ácido ascórbico* o *vitamina C*, un antioxidante hidrosoluble de bajo peso molecular y localizado en citosol, plasma y líquido extracelular de animales y plantas (Osato *et al.*, 1995). Reacciona rápidamente con el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno e incluso más rápidamente con el radical hidroxilo, pasando a deshidroascorbico. Por otro lado el ácido ascórbico participa en la restauración de vitamina E reducida (Fritsma, 1983). Además, se ha observado que puede ser, a altas concentraciones y en determinadas situaciones un pro-oxidante (Chakraborty *et al.*, 2014).

La *vitamina E* incluye a 8 nutrientes liposolubles llamados tocoferoles, de todos ellos el d- $\alpha$  tocoferol, es el principal antioxidante de las membranas celulares (Sies, 1991; Brohee y Neve, 1995). Su capacidad antioxidante suele atribuirse al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol. Su alta solubilidad en lípidos le permite acceder directamente a los grupos peroxilo, frenar la reacción en cadena y evitar la fragmentación de los hidroperóxidos lipídicos (Fritsma, 1983; Burton *et al.*, 1983). Además, se le ha atribuido otras funciones alternativas, independientes de su función antioxidante como la regulación de los procesos de señalización celular, expresión génica y otras actividades enzimáticas (Azzi, 2004; Brigelius-Flohe, 2005). Se considera de gran importancia esta vitamina para el mantenimiento y desarrollo de muchas funciones fisiológicas (Traber, 1999, 2014).

Otros compuestos de carácter antioxidante son los *polifenoles*, un grupo de más de 8000 compuestos entre lo que se encuentran muy estudiados como el resveratrol. Poseen propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias modulando la funciones de los fagocitos, inhiben la oxidación de las LDL, induce la apoptosis en células tumorales y reduce el daño al ADN (Miura *et al.*, 2000; Leiro *et al.*, 2002).

Finalmente, los metales como selenio (Se), zinc (Zn), manganeso (Mn) y cobre (Cu) juegan un importante papel en el organismo para proteger a los tejidos del daño ejercido por las ROS, principales catalizadores y cofactores del sitio activo de varias enzimas antioxidantes (Leung, 1998; Tapiero *et al.*, 2003).

Un grupo importante de antioxidantes en el que se encuentran los utilizados en la presente tesis, es el de los tiólicos. En este grupo tenemos, la *N-acetilcisteína (NAC)* y el *ácido tiazolidin carboxílico o tioprolina (TP)*, el interés por estos compuestos ha aumentado enormemente, ya que desempeñan un papel fisiológico esencial porque actúan como precursores del GSH (Meister y Anderson 1983; Flora *et al.*, 1991; De Flora *et al.*, 1995). De forma indirecta estos antioxidantes pueden modular la señalización intracelular, ya que se tiene conocimiento que muchas rutas de señalización son sensibles al estado redox (GSSG/GSH) de las células (Dröge, 2003). La NAC es una forma acetilada del aminoácido (aa) cisteína siendo, mucho más estable (Borgtröm *et al.*, 1986), y la TP es un aminoácido sulfúrico cíclico con estructura similar a la prolina, metabolito natural de origen hepático y actúa como un antioxidante secuestrando radicales libres, de ese modo protege las membranas celulares y el ADN mitocondrial (Shubert 1936; Bollier y Martin, 1972; Gosálvez *et al.*, 1979).

Muchos estudios con suplementación con estos antioxidantes tiólicos, tanto en insectos y ratones, retrasan la involución que tiene lugar con la edad en ciertos

parámetros bioquímicos y funcionales (Miquel y Blasco, 1978; Miquel *et al.*, 1984). Además, la posible aplicación clínica de la TP y el NAC en varias enfermedades degenerativas crónicas donde se encuentran niveles bajos de GSH en sangre (Harding *et al.*, 1996). Los antioxidantes tiólicos han demostrado gran eficacia para proteger las funciones del sistema inmunitario, que es muy sensible tanto al estrés oxidativo como a la función moduladora del cociente tiol reducido/ tiol oxidado (De la Fuente y Víctor, 2000). Por ello no puede sorprender que muestren una acción beneficiosa, los dos antioxidantes tiólicos ya mencionados (la TP y la NAC) en las funciones inmunitarias de modelos de ratones (De la Fuente y Miquel, 1994; Puerto *et al.*, 2002). Son interesantes los antioxidantes tiólicos, por su posible relevancia para aplicaciones clínicas de, que los efectos beneficiosos de la TP son más evidentes en un modelo de inmunodepresión en ratones que envejecen prematuramente, a causa de sus altos niveles de ansiedad, que en los ratones control de la misma edad que envejecen normalmente (Correa *et al.*, 1999). Por otro lado, la NAC, es capaz de inhibir la apoptosis mediada por el TNF- $\alpha$  en células monomielocíticas y timocitos inducidas por el exceso de ROS (Malorni *et al.*, 1993; McLaughlin *et al.*, 1996), así como procesos de metástasis (De la Flora *et al.*, 1995).

No obstante, estos sistemas defensivos no son perfectos, y cuando la producción de ROS supera la de las defensas antioxidantes se produce un estrés oxidativo con el consecuente daño celular (Fusco *et al.*, 2007).

### 1.4.2. El sistema inmunitario y el estrés oxidativo

El sistema inmunológico está muy relacionado con el estrés oxidativo del organismo. De hecho, la función de sus células, está en muchos casos mediada con la producción de las ROS. Así, la actividad microbicida de los fagocitos y función de

los linfocitos como la linfoproliferación o la actividad NK anti-tumoral, están ligadas a la producción de ROS, que como efecto secundario pueden alterar la competencia de dicho sistema debido a las reacciones oxidativas no programadas con los ácidos nucleicos, los lípidos de membranas, proteínas y carbohidratos (Miquel y Ramírez, 2004). Además, las células inmunitarias son muy sensibles a la oxidación, por el alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) presente en sus membranas, el papel importante en la señalización celular de las mismas (Meydani *et al.*, 1995), y en su función durante la eliminación de agentes patógenos mediante la utilización de ROS, por lo que los leucocitos son una fuente importante de oxidantes (Vida *et al.*, 2014).

Todas las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos), tienen en común una serie de mecanismos a través de los cuales se producen un aumento en el consumo de oxígeno. Así, esta molécula es fuente de agentes tóxicos como el radical superóxido  $O_2^-$ , peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , radicales hidróxilo  $OH^\bullet$  y el oxígeno necesarios para destruir organismo fagocitados y otras dianas extracelulares. Al inicio del proceso fagocítico, aumenta en consumo de oxígeno lo que implica el fenómeno conocido como estallido respiratorio (Takao *et al.*, 1996; Braga *et al.*, 1998; Vázquez -Torres *et al.*, 2000). En estos mecanismos hay una participación importante de la NADPH oxidasa, la cual se activa cuando el fagocito se ve expuesto a estímulos quimioatrayentes, dándose una cascada de señalización para la formación de ROS, donde figura el anión superóxido. Este sistema enzimático participa en la acción microbicida temprana de macrófagos, a diferencia del óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) producido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que interviene tanto en la fase temprana como tardía del proceso microbicida. El anión superóxido se metaboliza en



peróxido de hidrógeno, el cual en altas concentraciones es un agente exterminador de microorganismos y también en la acción citotóxica de estas células (Vazquez-Torres *et al.*, 2000; Babior, 2002; Gwinn y Vallyathan, 2006; Paiva y Bozza, 2014). Con respecto, a la acción citotóxica llevada a cabo por las células NK, también se liberan unas cantidades elevadas de ROS, que al igual que los linfocitos juegan un papel importante en la cascada de señalización intracelular y la proliferación. Donde el papel más relevante de esa acción es llevada a cabo por la activación del NF- $\kappa$ B (Vida *et al.*, 2014; Paiva y Bozza, 2014).

Como ya se ha indicado, el funcionamiento de nuestro organismo se basa en un perfecto equilibrio entre los niveles de oxidantes (ROS) y antioxidantes, y la pérdida de ese equilibrio conllevaría una situación de estrés oxidativo que subyace en el envejecimiento y enfermedad. En línea con ello, existe una amplia batería de defensas antioxidantes, tanto de tipo enzimático como no-enzimático, ha emergido y se ha conservado durante la evolución animal, constituyendo una segunda línea de defensa que contribuye a mantener la homeostasis del estrés oxidativo celular (Halliwell y Gutteridge, 2006). Uno de los sistemas endógenos que cooperan en el mantenimiento de la homeostasis del estrés oxidativo celular, es el *glutación* (GSH), principal antioxidante no-enzimático del compartimiento hidrofílico. La actividad antioxidante del GSH reside en el grupo tiol reducido de su resto de cisteína. El GSH puede reaccionar directamente con los ROS o puede actuar como co-sustrato de las enzimas Gpx (Meydani *et al.*, 1995; Pandey y Rizvi, 2010). Otras dos enzimas que participan en la eliminación del peróxido de hidrógeno que cinéticamente son complementarias son la catalasa (CAT) y la glutación peroxidasa (Gpx). La CAT es una de las enzimas más activas y elimina  $H_2O_2$ , por lo que su eficacia se manifiesta a elevadas concentraciones de  $H_2O_2$  (Naudí *et al.*, 2009). Por otro lado, las Gpxs

(tanto las formas de selenio, como no-selenio dependientes), son mucho mas funcionales en concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno, ya que presenta un elevada afinidad pero una baja tasa catalítica (Naudí *et al.*, 2009). ). Por lo tanto, es importante cantidades óptimas de compuestos antioxidantes es un aspecto vital para el mantenimiento de la respuesta inmunitaria. De hecho, se ha generado un gran interés en el conocimiento de alimentos con propiedades inmunomoduladoras, que puedan mejorar la funcionalidad de las células inmunitarias, dada a la producción de ROS que realizan durante su función (Hernanz *et al.*, 1990; De la Fuente *et al.*, 2011; Vida *et al.*, 2014). Además, hay investigaciones que respaldan la asociación del aporte inadecuado durante la ingesta de energía y macronutrientes en el empeoramiento de la función inmunitaria (Miquel, 2002; Chandra, 2002, 2004; Marcos *et al.*, 2011).

### 1.4.3. Estrés oxidativo y el sistema inmunitario en el envejecimiento

El deterioro asociado del sistema inmunitario con el envejecimiento, podría ser el resultado de un aumento de ROS o de la disminución de compuestos y actividades de enzimas antioxidantes. De hecho, las modificaciones del equilibrio redox se ve reflejado en alteraciones en la funcionalidad de las células inmunitarias (De la Fuente *et al.*, 2005; Vida *et al.*, 2014). Además, existen claras evidencias que muchos tipos celulares (fibroblastos, linfocitos, NK, fagocitos, etc) producen ROS para llevar a cabo sus funciones, y que éstas ROS pueden ser perjudiciales o beneficiosas dependiendo de su localización y concentración (Brieger *et al.*, 2012; Paiva y Bozza, 2014), y que su producción aumenta al envejecer al igual que los compuestos inflamatorios (De la Fuente *et al.*, 2011; Vida *et al.*, 2014). Estos cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias con el envejecimiento

podría ser a causa de un estrés oxidativo crónico que experimentan las mismas con el paso del tiempo (De la Fuente *et al.*, 2005; Vida *et al.*, 2014). Estudios postulan que las mitocondrias, parecen ser la fuente principal de lesiones oxidativas que se acumulan con la edad, y que favorecen la generación continua de ROS dando lugar a un estrés oxidativo crónico (Shigenaga *et al.*, 1994; Sastre *et al.*, 2000; Sastre *et al.*, 2003). En línea con ello, se demostró que el daño oxidativo al ADN mitocondrial está inversamente relacionado con la longevidad máxima de diversas especies de mamíferos (Barja y Herrero, 2000), y que el estrés oxidativo mitocondrial favorece la apoptosis a través de la vía intrínseca dependiente de la mitocondria (Esteve *et al.*, 1999), como se observó en los eventos de apoptosis dependiente de mitocondria en timocitos (Bustamente *et al.*, 2004). Considerandose a las mitocondrias como mediadores claves en la muerte celular por apoptosis (Sastre *et al.*, 2009). También se ha considerado que las ROS, afectan a la vida media de las especies, a través de las vías de transducción de señales sensibles al estrés oxidativo, que están implicadas en la patogenia de enfermedades degenerativas propias de la edad (Sastre *et al.*, 2003). Por otro lado, la xantina (compuesto oxidante), aumenta con el envejecimiento en diversas localizaciones de roedores, como el hígado, la corteza cerebral, los leucocitos peritoneales y el plasma (Arranz *et al.*, 2010a; Vida *et al.*, 2011; 2014). Además, en otro estudio se reportó un incremento en la concentración de coenzima Q, que interviene en la formación de radicales de hidroxilo al reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de iones metálicos, como catalizadores y no requiere de protones que compensen la carga, en tejido murino de animales viejos (Sohal *et al.*, 1990).

Otra característica constitutiva de las especies animales más longevas y que ha permitido establecer una relación entre el envejecimiento y el estrés oxidativo

(Seis, 1985), es el grado de instauración de los ácidos grasos presentes en la membranas celulares (Pamplona *et al.*, 2000, 2004). Con la edad aumentan las concentraciones de lipofucsina en la célula, el componente mayoritario de este pigmento del envejecimiento es producto de la peroxidación lípida (Sohal y Allen, 1990; Sohal, 1993; Oenzil *et al.*, 1994). Por otro lado, se han utilizado los niveles de exhalación de alcanos como indicador de la peroxidación *in vivo* en mamíferos e insectos (el n-pentano y el etano productos del catabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6) y se ha observado que son mayores en los animales envejecidos en comparación con los animales jóvenes (Shull y Heints, 1991; Villa y Gorini, 1993).

En que respecta a los factores inflamatorios, que son parte de las células inmunitarias durante su función, pueden aumentarse al envejecer, como el TNF $\alpha$ , prostaglandinas E<sub>2</sub> y el NO, entre otros. Centrandonos en el TNF $\alpha$ , se ha comprobado que a bajas concentraciones promueve la respuesta inmunitaria y retrasa la apoptosis de neutrófilos pero en altas concentraciones de esta citoquina aumentan la apoptosis de neutrófilos (Van der Berg *et al.*, 2001), células T y B (Takahashi *et al.*, 2012) y potencia el shock endotóxico (Pierre, 1992). Muchos estudios apunta que esta citoquina pro-inflamatoria aumenta con la edad (Tang *et al.*, 2000; Lord *et al.*, 2001; De La Fuente *et al.*, 2001a; De la Fuente *et al.*, 2004) y en ratones con envejecimiento prematuro (Guayerbas *et al.*, 2002c, 2004). Su elevada liberación esta claramente relacionada con el estado oxidativo del individuo (Victor y De la Fuente, 2002b).

En otro orden de ideas, las diferencias entre machos y hembras tiene base por la ventaja para estas ultimas, ya que los estrógenos inducen la expresión de enzimas antioxidantes, y ello protege frente al estrés oxidativo, y por tanto les

confiere mayor longevidad (Borras *et al.*, 2003). Por otro lado, también las hormonas sexuales sufren un declive que puede ser radical (estrógenos en la mujer) o paulatino (testosterona en el hombre). Los estrógenos que potencian la inmunidad humoral, mientras que los andrógenos y la progesterona actúan como inmunosupresores naturales. Además, el estradiol inhibe la expresión génica y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación del NF-kB, factores que se encuentran relacionado con el daño oxidativo (Luiking *et al.*, 2010; Espino *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2012).

Actualmente, se ha demostrado que, no sólo la producción de radicales libres, sino también los antioxidantes, juegan un papel relevante en el mantenimiento del estado redox. Uno de los antioxidantes intracelulares más importante es el glutatión reducido (GSH). Diversos estudios, revelan que con el envejecimiento, tiene lugar una disminución de los niveles del GSH en leucocitos peritoneales de ratón, así como en eritrocitos, y en plasma, de hombres y mujeres (Samiec *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a), lo que ha llevado a proponerlo como predictor de morbilidad y mortalidad (Meydani *et al.*, 1995). La presencia *in vitro* de glutatión estimula una serie de funciones de la células inmunitarias peritoneales, de enzimas antioxidantes (CAT, GPx, GR) y disminuye la incidencia de muerte programada en leucocitos peritoneales de ratón (Pomaki *et al.*, 2005). Además, la disminución del GSH, conllevaría a importantes trastornos neuroinmunitarios (Morris *et al.*, 2014). Por otro lado, la CAT no muestra diferencias con el envejecimiento en leucocitos peritoneales de ratón y en eritrocitos y neutrófilos de hombres y mujeres de 65-75 años de edad en relación a personas más jóvenes (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a).

Cabe destacar que la teoría propuesta de una *oxi-inflamm-aging*, nos aporta una visualización más concreta e interrelacionada de los procesos complejos que acontecen con el envejecimiento (De la Fuente y Miquel, 2009).

### 1.5. Shock endotóxico

Uno de los retos más importantes para la medicina especialmente la ejercida en las unidades de cuidados intensivos, ha sido el tratamiento de pacientes gravemente enfermos por sepsis (Dellinger, 2003).

Sería conveniente definir diversos términos para poder centrar el tema. La palabra sepsis es derivada de la lengua griega, sinónimo de putrefacción caracterizada por mal olor. Shock es derivado de la raíz francesa “choquer”, que significa “chocar contra”. Dada la ambigüedad presentada por múltiples definiciones a lo largo de muchos años no es sino hasta la conferencia de consenso del American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine (1991) (Bone *et al.*, 1992, Ramirez, 2013) cuando se propusieron una serie de definiciones que hoy en día son de aceptación general:

**A) Infección:** fenómeno microbiano caracterizado por una respuesta inflamatoria a la presencia de microorganismos o a la invasión de tejido normalmente estéril del huésped por esos organismos.

**B) Bacteriemia:** es la presencia de bacterias viables en la sangre.

**C) Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS):** son una expresión clínica de la acción de agentes exógenos y mediadores intrínsecos que dan como resultado un cuadro de inflamación sistémica. Los SIRS pueden ser inducidos por diferentes eventos tales como procesos infecciosos, y por estímulos no infecciosos como son la injuria por isquemia/ reperusión, el insulto térmico, el shock

hemorrágico y traumático, las pancreatitis y las cirugías (Bone *et al.*, 1992; Bone, 1993; Nystrom, 1998). El SRIS se caracteriza por la presencia de dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas: 1) Temperatura corporal de  $> 38^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$ ; 2) Frecuencia Cardíaca de  $> 90$  latidos por minuto; 3) Taquipnea: frecuencia respiratoria  $> 20$  resp./min. o hiperventilación evidenciada por una  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg; 4) Alteración del recuento leucocitario  $> 12.000$  c /mm<sup>3</sup>, o  $< 4.000$  c /mm<sup>3</sup>, o presencia de  $> 10$  neutrófilos en banda. Estas manifestaciones deben representar una alteración aguda y no responder a causas conocidas, recomendándose el empleo concomitante de un sistema de score de severidad de enfermedad (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation APACHE), a fin de establecer adecuadamente la severidad y evitar la inclusión de pacientes con enfermedad banal (Lovesio, 2001).

**D) Sepsis:** Se define a aquellos pacientes con características clínicas del SRIS en respuesta a un proceso infeccioso activo. Se considera, *sepsis severa*, cuando se asocia con disfunción orgánica, anormalidades de la perfusión o hipotensión dependiente de la sepsis y que responde a la adecuada administración de líquidos (Lo Presti, 2004). Las anormalidades de la perfusión pueden incluir pero no estar limitadas a acidosis láctica, oliguria, y / o alteraciones agudas del sensorio.

**E) Shock séptico:** Se define por la presencia de hipotensión persistente (Presión arterial sistólica [PAS]  $< 90$  mmHg, Presión arterial media [PAM]  $< 60$  mmHg, o una disminución de la PAM de más de 40 mmHg en un sujeto previamente hipertenso), a pesar de la adecuada reanimación con fluidos, asociada con anormalidades por hipoperfusión o signos de disfunción orgánica. Los pacientes que requieren inotrópicos para mantener una presión arterial normal también deben considerarse en shock séptico.

**F) Síndrome de disfunción multiorgánica (MOD):** presencia de alteraciones en la función de un paciente agudamente enfermo cuya hemostasia no puede ser mantenida sin la intervención terapéutica (Bone *et al.*, 1992, Matot *et al.*, 2001; Balk, 2004).

En este apartado destacaremos primordialmente el shock endotóxico o séptico, en primera instancia el término *shock* define la situación de extrema gravedad consecuencia de cualquier tipo de agresión contra el organismo y se caracteriza por una disminución del flujo sanguíneo, lo que conlleva a una hipoperfusión que supone una hipoxia tisular y alteración del metabolismo celular (Kovach, 1973; Hinshaw *et al.*, 1997) (Figura 4). Este conjunto de manifestaciones patológicas, cada vez más grave (Dunham, 1982), ha sido clasificada por Hardaway (1966) en dos etapas:

- 1) Shock reversible o shock moderado, y
- 2) Shock irreversible o shock severo.

El término “*Choc*” fue utilizado por primera vez por el médico francés Le Dran en 1743, y desde entonces hasta la actualidad se han desarrollado numerosas aproximaciones experimentales para intentar esclarecer la compleja fisiopatología de los fenómenos de shock (Tabla 1).

Bajo el término del shock se incluyen una serie de alteraciones que aparecen con hemorragias graves, infarto de miocardio, obstrucción cardíaca, embolia pulmonar generalizada, traumatismos, quemaduras e infección bacteriana masiva, clasificándose cada tipos de shock según su etiología en hemorrágico, cardiogénico, neurogénico, traumático y séptico (Figura 4) (Catalá , 2002).



### Perspectivas Históricas del Shock

(1743) Le Dran. Usa por primera vez la palabra "Choc", para indicar las sucuelas clínicas de pacientes que han sufrido un traumatismo.

(1867) E.A Morris. Usa por primera vez el término de Shock y publica la monografía "Un tratamiento práctico en el shock tras operaciones y lesiones".

(1899) G.W Grile. Comienza la era experimental con la publicación de "Una investigación experimental en el shock quirúrgico".

(1899) Brill y Libman. Describen casos clínicos de bacterias Gram-negativas.

(1938) V.H Moon. Inicia la investigación en la fisiología del shock "Shock y fenómenos capilares relacionados".

(1948) Spink. Indica que las endotoxinas participan en la instauración del shock.

(1950) Wiggers. Llega la era moderna en los estudios de shock con la aparición de la "Fisiología del shock".

1951 Wisbren

1951 Borden y Hall

1953 Braude

1956 Studdiiford y Douglas

Estudios sobre Bacteremia y Shock endotóxico.

1957 hasta la actualidad desarrollo de nuevos modelos experimental, especialmente los relacionados con el shock endotóxico.

**Tabla 1. Evolución histórica del shock.**

Muchas infecciones pueden cursar con shock séptico, sin embargo, son principalmente responsables de esta situación clínica los bacilos Gram-negativos, capaces de liberar ciertos lipopolisacáridos (LPS) de su membrana celular al torrente sanguíneo adquiriendo características de endotoxinas (Morrison *et al*, 1978). Así, el término *shock séptico*, designa el estado de disfunción metabólico-circulatoria aguda (Hinshaw *et al*, 1983), que se desencadena tras la liberación en el organismo de endotoxinas bacterianas, secundaria a un proceso séptico principal (Berry, 1977). Se han descrito casos de *shock endotóxico* que suelen ser indistinguibles clínicamente del shock séptico (Ravin *et al*, 1960; CDC, 1998), por administración de medicación parenteral contaminada con endotoxina. Dado que está ampliamente aceptado que las endotoxinas son los agentes etiológicos

responsables del shock séptico (Bones, 1991; Danner *et al.*, 1991), se habla indistintamente de shock séptico o shock endotóxico.

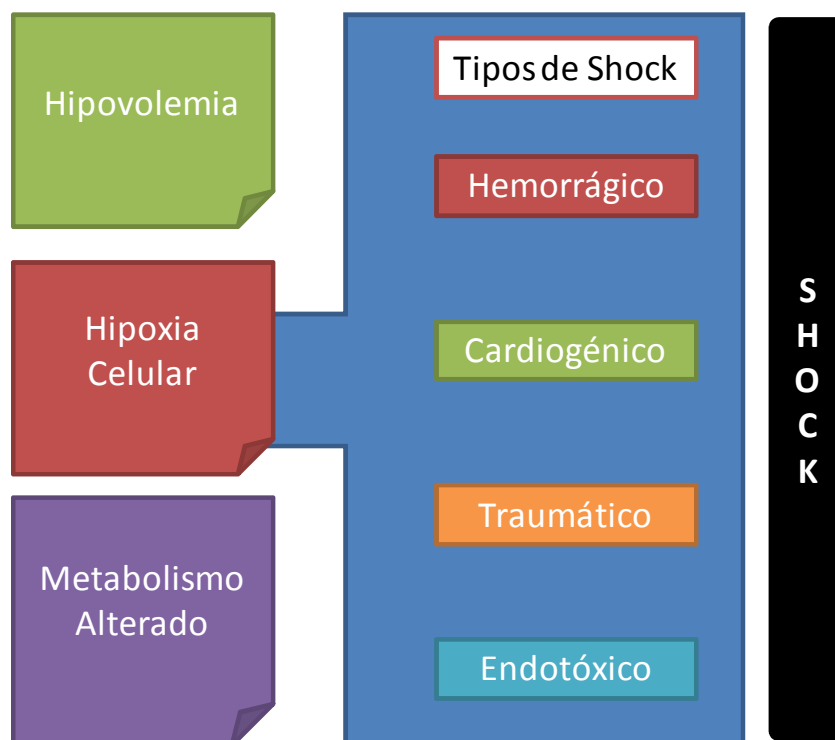
La bacteriemia es un fenómeno transitorio, fácilmente controlado en sujetos sanos. Sin embargo, en ciertos casos (edades avanzadas, inmunodeficiencias enfermedades crónicas), el estímulo séptico junto con la agresión microbiana induce una cascada de alteraciones metabólicas y hemodinámicas cuya consecuencia clínica es el *shock séptico* o endotóxico.

Los síntomas clínicos que aparecen en el shock endotóxico o séptico incluyen un aumento de la temperatura corporal, taquicardia con pulso débil, hipotensión, dolor muscular, alteraciones neuropsíquicas, vómitos, diarreas, anorexia y bloqueo gástrico (Mayer *et al.*, 2013). La instauración y progresión de este tipo de shock, se pueden distinguir dos fases considerando tanto las características cardiovasculares como las metabólicas, ver figura 5 (Weil, 1972; Hinshaw, 1972; Nishijima *et al.*, 1973; Biesel, 1975): 1) Fase inicial (Altura, 1983) o shock hiperdinámico (Majerus, 1984); 2) Fase final (Altura, 1983) o shock hipodinámico (Majerus, 1984).

Si el proceso continúa se produce una reducción del suministro de energía a los tejidos periféricos apareciendo hipoglucemia, hipoxia y acidosis metabólica que desembocan en un estado crítico con síndrome de distress respiratorio agudo (ARDS), y una coagulación intravascular diseminada (DIC) (Hate *et al.*, 1986; Zimmerman y Dietrich, 1987).

Los factores hemodinámicos son los que dominan el cuadro patológico, conllevan a un estado final caracterizado por una grave disfunción generalizada que ocasiona lesiones celulares (McGovern y Tiller, 1980; Trum *et al.*, 1982; Schumer, 1983), cuya magnitud determina la reversibilidad o irreversibilidad del

shock. Desde el estudio por Waisbren en 1951, en el que señalaban unos 29 casos de bacteriemia, se llegó a 330.000 en 1974 (por bacterias Gram-negativas) de los cuales 132.000 llegaron a un estado irreversible de muerte (McCabe, 1974). Esto ha hecho que se tenga una creciente preocupación por abordar adecuadamente la septicemia (Morrison y Oades, 1979; Majerus, 1974). De hecho, el shock endotóxico es una de las causas más frecuentes de mortalidad en los enfermos recluidos en las unidades de cuidados intensivos (Palencia, 2004). Se estima que en Estados Unidos tienen lugar de 600.000 a 750.000 casos anualmente y más de 210.000 de ellos suponen la muerte del individuo (Lovesio, 2001; Bosmann y Ward, 2013).

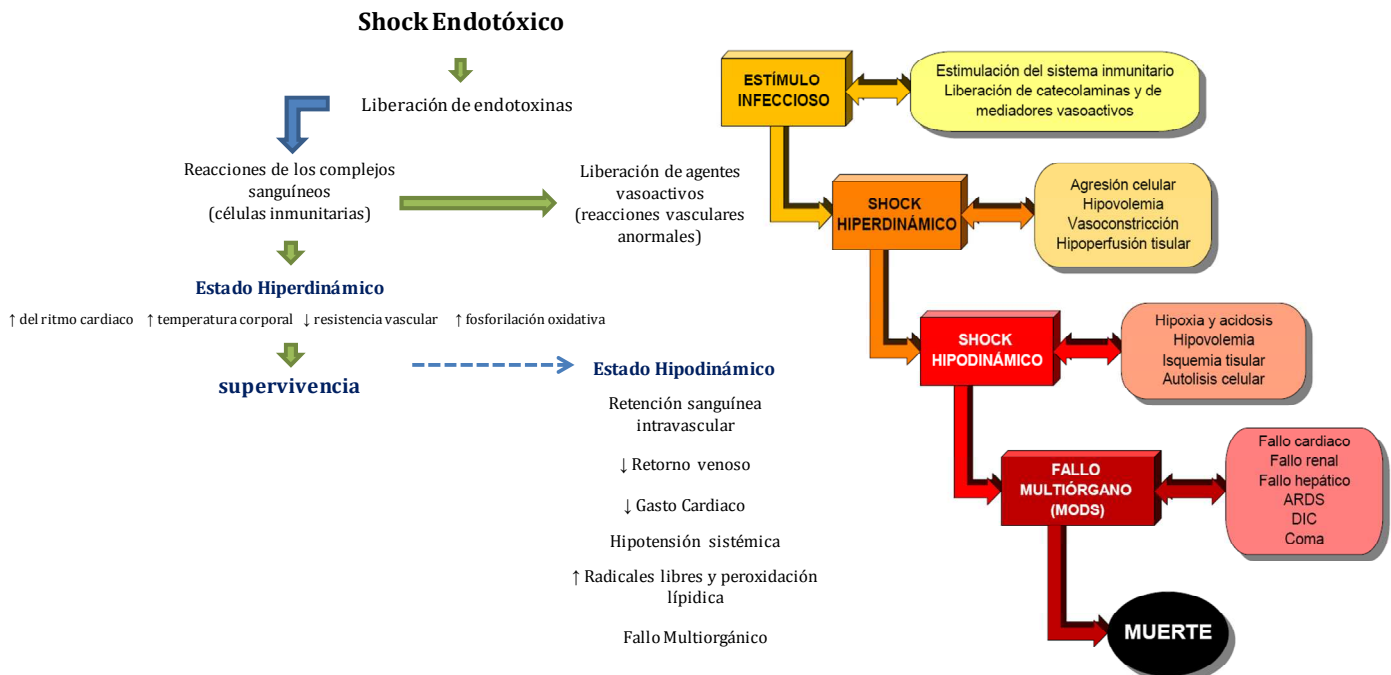


**Figura 4.** Etiología y tipos de shock.

Datos recogidos de 61.874 admisiones a 92 unidades de cuidado intensivo en Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte mostraron que la prevalencia de sepsis

severa en las primeras 24 horas de admisión es de 27,7%, con una tasa de mortalidad global del 44,7%. Otro estudio refiere que de 1618 admisiones a unidades de cuidado intensivo en Escocia el 46% de los pacientes desarrollaron sepsis severa durante su estadía en cuidados intensivos con muchos pacientes que progresaron a shock séptico (Smithies y Weaver, 2004). La sepsis severa y el shock séptico son entidades no solo altamente frecuentes en las unidades de cuidados intensivos en el mundo sino que constituyen *per se* un elevado riesgo de muerte en países desarrollados. A pesar de los avances médicos realizados en las últimas décadas, la mortalidad del shock séptico sigue situándose entre 40-82% (Martin *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2001). La mayor incidencia de los procesos de shock endotóxico o séptico, se asocia a la aparición de cepas resistentes a la acción de los antibióticos que favorecen la infecciones hospitalarias producidas por las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Aniaga, 1992).

Por lo indicado, se han utilizado múltiples modelos experimentales que permitan profundizar en las acciones de la endotoxina en el organismo y conocer mejor las alteraciones producidas por las mismas. Principalmente podemos distinguir dos grupos: A) Estudios *in vivo*, en la que el shock endotóxico se ha inducido en perros (Garcia-Barreno, 1978, 1978a), primates, cerdos (Cano *et al.*, 1988), y ovejas (Traber, 2000). Sin embargo, por su mayor simplicidad de manejo se recurre cada vez más a los modelos del shock endotóxico en ratas (Bitzer-Quintero *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2014) y ratones (Víctor *et al.*, 1997, Víctor y De la Fuente, 2000; Li *et al.*, 2014). B) Los estudios *in vitro*, utilizan líneas celulares puras o co-cultivadas: plaquetas, macrófagos peritoneales, neutrofilos, pneumocitos, células adrenocorticales, células parenquimatosas hepáticas y células de Kupffer (Portoles *et al.*, 1993; Benito *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Fases de instauración y evolución del shock endotóxico.

### 1.5.1. Endotóxicas

Richard Pfeiffer acuñó por primera vez el término endotoxina en el año 1904, sus experimentos con *V. cholerae* lo llevaron a considerar la existencia de una sustancia tóxica, estable al calor que se asociaba con la parte insoluble de la célula bacteriana. Denominó a esta sustancia endotoxina, del griego “endo” que significa dentro (Pfeiffer, 1892; Wolff, 1904). Las endotoxinas son complejos macromoleculares constituidos por lipopolisacáridos (LPS) y proteínas, estas han sido aisladas y descritas por Boivin y Messrobeanu (1933). Las endotoxinas son componentes de la membrana exterior de las bacterias, son capaces de provocar infecciones hemodinámicas, fiebre, caquepsia, y en último término provocan un shock séptico y fallo multiorgánico que conlleva a la muerte (Figura 6) (Klabunde y

Costo, 1995). Muchas de las infecciones que pueden cursar como shock endotóxico, son principalmente causadas por bacilos Gram-negativos, capaces de liberar ciertos LPS de su membrana celular al torrente sanguíneo adquiriendo características de endotoxinas (Morrison y Ulvetich, 1978). Los términos endotoxina y LPS se utilizan indistintamente ya que los LPS poseen todas las actividades biológicas de las endotoxinas. Por esta razón se utilizan comúnmente LPS purificados en los estudios relativos a la patología del shock endotóxico (Berry, 1982; Rietschel *et al.*, 1982; Hitchcock *et al.*, 1986).

*Los Lipopolisacaridos (LPS)*, son constituyentes normales de la membrana externa de bacterias Gram negativas, que contribuyen en gran medida a la integridad estructural de la membrana bacteriana y a la protección de la misma, siendo un componente esencial para la vida y patogenicidad del microorganismo (Beutler y Rietschel, 2003). Las bacterias Gram negativas están delimitadas por una membrana citoplasmática interna, con peptidoglicanos y una membrana externa, donde se encuentran los LPS junto con proteínas y fosfolípidos (Gram, 1884; Ghuysen y Hakenbech, 1994).

El método de aislamiento de LPS más importante es el de *Westphal* (fenol/H<sub>2</sub>O, 45:55, V/V, a 68°C), ya que proporciona un LPS libre de contaminantes polipeptídicos (Westphal *et al.*, 1952). La estructura química del LPS consiste en una porción oligosacáridica hidrofílica unida a una porción lipídica hidrofóbica llamada Lípido A (Luderitz *et al.*, 1982). La porción oligosacáridica hidrofílica está desprovista de actividad endotóxica pero posee propiedades inmunoestimuladoras, y consta de una cadena O-específica y un núcleo basal (Figura 7) (Rietschel *et al.*, 1987; Arulkumaran *et al.*, 2012; Muhammad y Sangdun, 2014).

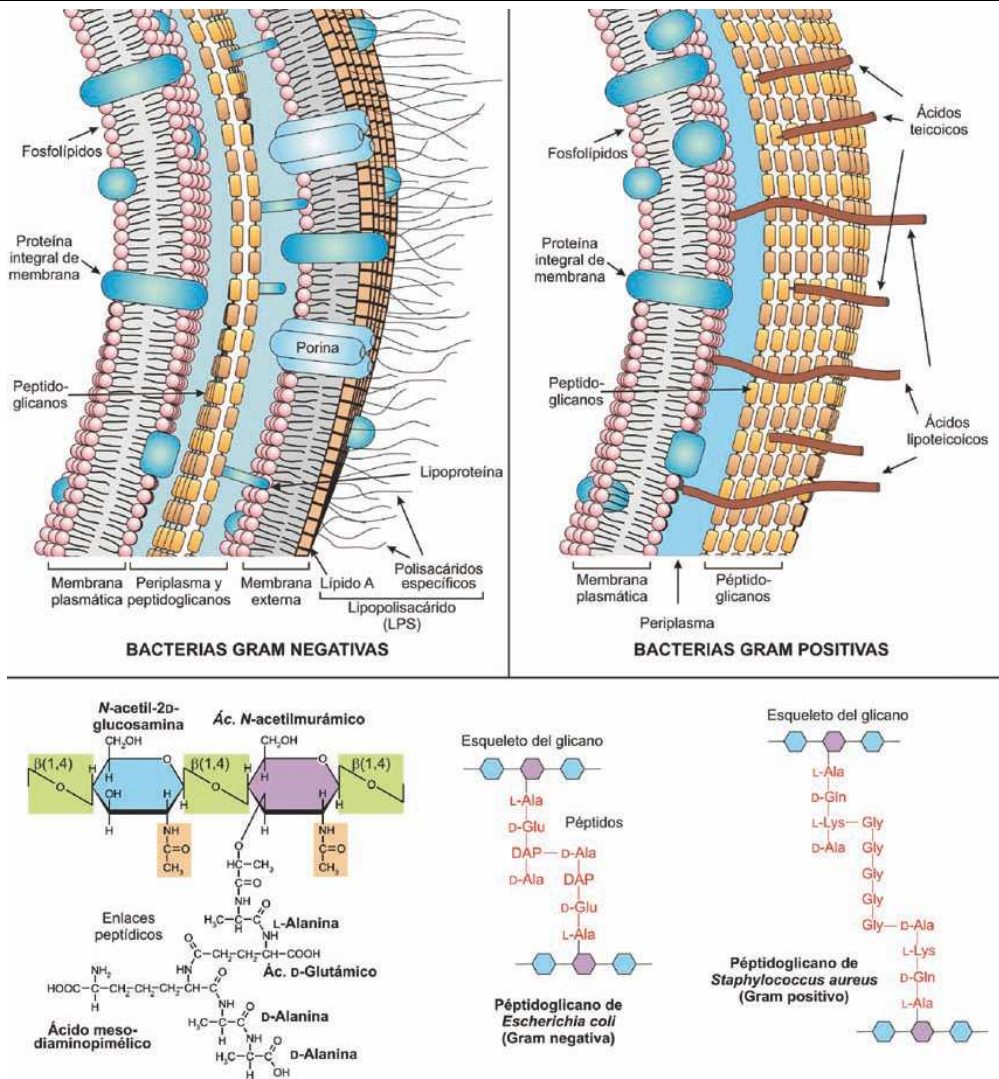
**Cadena O-antigénica o específica:** Está constituida por cadenas específicas unidas al núcleo consisten en una secuencia repetida de unidades de trisacárido o pentasacárido lineal, o bien pueden ser polímeros de oligosacáridos ramificados de cuatro a seis azúcares (Ghuysen, 1977; Luderitz *et al.*, 1982; Brade *et al.*, 1988). La longitud de las cadenas difieren aún en un mismo organismo, en un ámbito que varía desde 0 hasta 40 unidades repetitivas (Palva y Mákelá, 1980).

Los monosacáridos que componen las unidades repetitivas son azúcares neutros y acídicos, amino azúcares, y raras veces azúcares inusuales, tales como 6-desoxihexosas ó 3,6-didesoxihexosas. En modelos moleculares, la orientación espacial del polisacárido no asume una conformación ordenada y lineal, sino mas bien plegada (Palva y Mákelá, 1980), o doblada en un ángulo variable (Kastowski *et al.*, 1992). En bacterias no entéricas, como por ejemplo bacterias fotosintéticas, bacterias del suelo, o en patógenos tales como: *Neisseria*, *Pasteurella*, *Campylobacter*, *Bordetella* y *Bacteroides*, este polisacárido O esta totalmente ausente (Mayer *et al.*, 1989). En *Brucella* la cadena O es un homopolímero de un solo amino azúcar llamado perosamina (Caroff *et al.*, 1984, 2002). En otros géneros y familias bacterianas, hay presencia de azúcares metilados, acetilados o con otros grupos sustituyentes y amino azúcares que juegan el papel de estructuras “inmunodominantes” (Mayer *et al.*, 1985). La diversidad estructural de la cadena O puede ser aumentada por el proceso de conversión por bacteriófagos, el cual involucra la lisogenización (Rick, 1987). Algunos autores sugieren que la diversidad en estructura y composición de la cadena O pudo haberse desarrollado durante la evolución, al menos en especies endosimbióticas, con el fin de escapar al sistema inmunitario del hospedador mediante la presentación de nuevas especificidades en la superficie celular y así esconder las unidades más profundas,

esto es, el lípido A-núcleo interno, los cuales son esenciales para el crecimiento y multiplicación bacterianos. De esta manera, la cadena O protegería a las bacterias contra la fagocitosis y contra la acción bactericida de los componentes séricos (Mayer *et al.*, 1989).

**Núcleo de oligosacárido:** Es mucho más corto y menos heterogéneo que el O-antígeno. El oligosacárido nuclear puede ser subdividido en un subdominio interno y uno externo (Fox *et al.*, 1990). Los componentes del núcleo interno en *Salmonella* y *E. coli* incluyen ciertos azúcares únicos que son característicos del LPS, tales como el ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep) (Rick, 1987). El núcleo externo esta compuesto por hexosas, principalmente glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. La diversidad estructural de la región externa esta prácticamente limitada a los lipopolisacáridos de enterobacterias, en las cuales se encuentran de uno (*Salmonella*) a cinco (*E. coli*) tipos diferentes de núcleo (Mayer *et al.*, 1989). En especies no entéricas, el núcleo externo puede estar también presente, pero a menudo esta completamente ausente (Gibson *et al.*, 1989). Los residuos de KDO, o un derivado, está presente en todos los lipopolisacáridos conocidos, lo cual indica un papel esencial de este azúcar en la supervivencia y crecimiento de bacterias, particularmente a nivel del ensamblaje de la membrana externa, y confieren la unión del núcleo con el lípido A (Raetz, 1990).





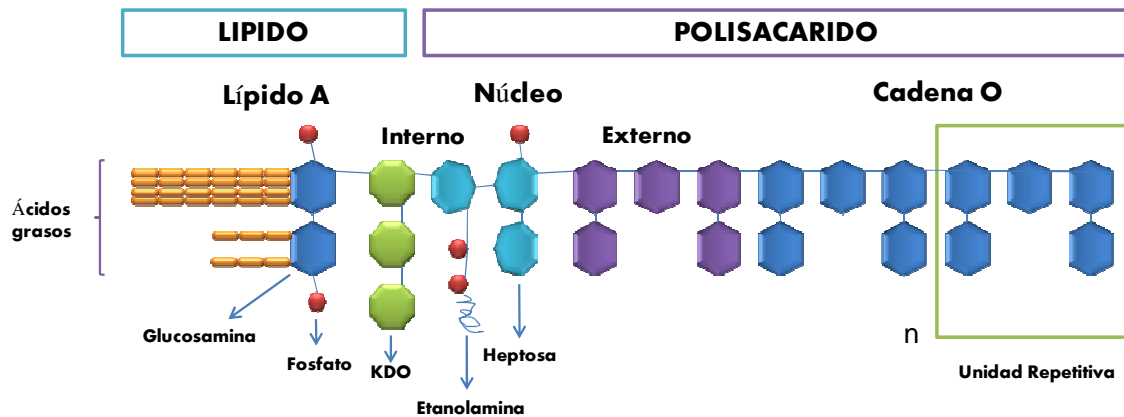
**Figura 6. Estructura de la membrana bacteriana.** La pared de una bacteria gram-negativa posee, rodeando la membrana plasmática, una capa de peptidoglicanos y una membrana externa. La pared de una bacteria gram-positiva, más sencilla, está formada por una capa de peptidoglicanos separada de la membrana plasmática por el espacio periplásmico. En la parte inferior de la figura se muestra la composición de la subunidad del péptidoglicano. El esqueleto del glicano contiene dos tipos de hidratos de carbono (NAG: N-acetilglucosamina y NAM: ácido N-acetilmurámico) y una corta cadena con cinco aminoácidos. En el péptidoglicano de bacterias gramnegativas la cadena peptídica está formada por un aminoácido proteico (L-Ala) y aminoácidos no proteicos (D-Ala, D-Glu y ácido meso-diaminopimélico). Las cadenas de glicano se unen por enlaces de covalentes establecidos entre las cadenas de aminoácidos perdiéndose un residuo de D-Ala y quedando las cadenas de tetrapéptidos entrecruzadas. En el péptidoglicano de bacterias grampositivas, las cadenas peptídicas tienen una composición en aminoácidos diferente y también difieren en el entrecruzamiento que se establece con la participación de un pentapéptido de Gly.

**Lípido A:** Es un disacárido de glucosamina bisfosforilado y acilado por cuatro moléculas de ácidos graso 3-hidroxilado con al menos dos residuos de aciloxiacilos (Rietschel *et al.*, 1984, 1987). Concretamente, el lípido A de *E. coli* y *S.*

*typhimurium* está constituido por un disacárido de glucosamina unido por un enlace  $\beta$ 1-6, esterificado en cuatro posiciones con ácidos grasos y sustituido por dos grupos fosfato en los extremos 1 y 4. El lípido A tiene un peso molecular aproximado de 1700 y se encuentran en la membrana externa de *E. coli* (Rick, 1987). El lípido A está unido al primer residuo de Kdo en el LPS (Strain *et al.*, 1983), y asume una conformación hexagonal, altamente densa y ordenada, en la cual el disacárido de glucosamina (GlcN), está en un ángulo aproximado de  $45^\circ$  con respecto a la superficie de la membrana (Labischjnski *et al.*, 1985). Dicha conformación se conserva en el LPS de tipo rugoso, especialmente cuando hay presencia de cationes divalentes ( $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ ). Es muy probable que en las membranas biológicas existan interacciones particulares entre moléculas de lípido A, así como entre lípido A y proteínas, las cuales jugarían un papel importante en el ensamblaje de la membrana externa. El lípido A es la estructura más conservada de la molécula de LPS (Su *et al.*, 1990).

Por su naturaleza anfipática los LPS tienden a formar agregados en solución acuosa de pesos moleculares que oscilan entre  $1 \times 10^6 D$  y  $20 \times 10^6 D$ , cuya estructura depende no sólo de su composición química sino del medio (pH, cationes metálicos, temperatura...), y se han propuesto un gran número de estructuras tridimensionales que incluyen estados micelares y laminares (Seydel *et al.*, 1989; Hayter *et al.*, 1987). Los estudios de criofractura revelan que los agregados de LPS son principalmente esféricos o elípticos de tamaño homogéneo, y por su naturaleza anfipática presentan una alta afinidad por las membranas insertándose en ellas de forma espontánea y rápida (Morrison, 1985; Brandenburg *et al.*, 2000). Estas moléculas de LPS, tienen efectos negativos y otros positivos tales como su

acción inmunopotenciadora y antitumoral (Fox *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 2008). En la tabla 2, se recoge un resumen de las propiedades biológicas de estas moléculas.



**Figura 7. Representación esquemática del lipopolisacárido (LPS).** Representación de sus tres regiones diferenciadas: un dominio hidrofóbico conformado por el lípido A y un dominio hidrofílico conformado por el núcleo corto de oligosacáridos y por el antígeno O (Imagen adaptada de Caroff *et al.*, 2002; Muhammad y Sangdun, 2014).

Muchas de sus actividades biológicas, tales como inmunogenicidad y antigenicidad (Brade *et al.*, 1987), inducción de la liberación de IL-6 y del leucotrieno C446, la mitogénesis (Chiller *et al.*, 1973) etc, tienen una estrecha relación con sus propiedades físicas, principalmente con la fluidez de la parte hidrocarbonada y de la estructura terciaria de los agregados (Seydel *et al.*, 2000). En diferentes estudios, se observó que el lípido A libre y los distintos lipopolisacáridos mutantes y salvajes, presentan diferencias en distintas ante pruebas biológicas (termorregulación). Por ejemplo, los mutantes rugosos (oligosacárido truncado), presentan una máxima fluidez a 37°C. Por el contrario, la cepa salvaje y el lípido A libre, presentan una menor fluidez a 37°C (Brandenburg *et al.*, 1990). Por su parte la sonicación de una suspensión acuosa de LPS reduce el

tamaño de los agregados y aumenta la pirogenicidad de las preparaciones de endotoxina (Komuro *et al.*, 1987).

Efectos nocivos	Efectos Beneficiosos
✓ Pirogenicidad	✓ Actividad mitogénica para las células B
✓ Sinergismo con hepatotoxinas	✓ Actividad necrótica de Tumores
✓ Leucopenia	✓ Actividad adyuvante
✓ Leucocitosis	✓ Aumento de la resistencia a infecciones
✓ Alteración de la coagulación	✓ Protección ante la radiación
✓ Activación del complemento	✓ Desarrollo normal de los órganos linfoides
✓ Hipotensión	✓ Protección ante la hiperoxia
✓ Activación del factor Hagemann	
✓ Acidosis	
✓ Toxicidad letal	
✓ Reacción de Schwartzman local	
✓ Inducción del activador del plasminógeno	

**Tabla 2.** Actividades biológicas de las Endotoxinas. (Westphal, 1993; Fox *et al.*, 1988).

### 1.5.2. Fisiopatología del shock endotóxico

Hoy en día cobra fuerza la teoría enunciada por Lewis Thomas durante los años 70, donde señala que la sepsis es una incontrolada respuesta defensiva del organismo, más que un efecto directo del microorganismo en sí (Hotchkiss y Karl, 2003). Múltiples investigaciones han puesto en manifiesto que durante los procesos infecciosos, el LPS liberado hacia el torrente sanguíneo desencadena un amplio espectro de actividades biológicas, siendo éste el interruptor estimulante tanto en células inmunitarias como no inmunitarias provocando una exacerbada respuesta sistémica (Bishop, 2005; Raetz y Whitfield, 2002). Dada a su naturaleza anfipática es capaz de interaccionar con lípidos, fosfolípidos, lipoproteínas, y

glicoproteínas, uniéndose inespecíficamente a diversos constituyentes de las membranas celulares, amplificando su efecto (Ortiz y Garnacho, 2005; Zhou *et al.*, 2000).

Es crucial que los sistemas celulares posean un equilibrio de regulación entre la protección y respuesta, ya que la sepsis se caracteriza por una pérdida en este equilibrio, dando lugar a una respuesta inflamatoria de dos fases: A) hiperdinámica y B) hipodinámica (Figura, 8).

Durante la fase *hiperdinámica*, el organismo se manifiesta con una respuesta inflamatoria hiperactiva, que involucra respuestas celulares y humorales, donde las células endoteliales, epiteliales, neutrófilos, macrófagos y linfocitos, producen mediadores pro-inflamatorios (por ejemplo, factor de necrosis tumoral, TNF $\alpha$ , interleuquina IL6, IL1 e IL8), facilitando la inflamación, adhesión de leucocitos, y activación de la cascada de complemento (C3a y C5a) (Mayer *et al.*, 2013). Este cuadro de producción de citoquinas pro-inflamatorias habitualmente se le denomina “*cytokine storm*”, esto es “*tormenta de citoquinas*”, haciendo alusión a un tipo particular de respuesta inmunitaria descontrolada que se observa en diferentes cuadros de SIRS (Ferrara, 1993; Makhija y Kingsnorth, 2002). Dicho fenómeno constituye una reacción inmunitaria potencialmente fatal, en la cual se induce una interacción entre la producción de citoquinas y las células inmunitarias (especialmente las fagocíticas) que se retroalimentan continuamente, induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (tales como, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Matsuda y Hattori, 2006).

Las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son capaces de causar daños en los tejidos, aumento de la permeabilidad vascular y, en última instancia, lesión de órganos (Bosman y Ward, 2013). Además, facilitan la atracción y la

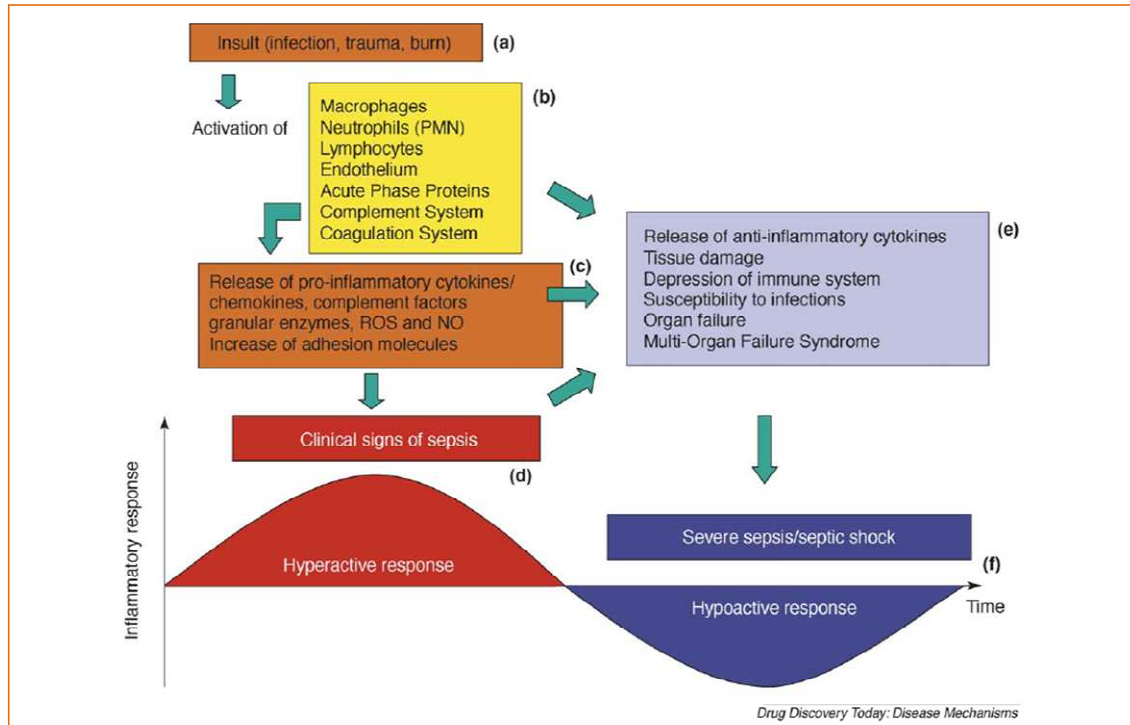
transmigración de las células al sitio de la infección, al aumentar la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (por ejemplo, ICAM-1, E-selectina), en neutrófilos (por ejemplo, CD11b / CD18), y otros leucocitos aumentando su reclutamiento a los tejidos. Además, aumentan la coagulación, lo que puede dar lugar a una coagulopatía intravascular diseminada (CID). La fase hiperdinámica, también se caracteriza por el aumento de la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco así como una mayor la resistencia vascular sistémica (Laszlo *et al.*, 2004; Bosman y Ward, 2013).

La fase *hipodinámica* aparece como una etapa posterior de la sepsis, siendo una respuesta compensatoria a la exacerbada inflamación que tiene lugar por la “tormenta de citoquinas”. Así, mediadores anti-inflamatorios tales como: citoquinas IL-10 e IL-13 (Brandtzaeg *et al.*, 1996), el receptor soluble del factor de necrosis tumoral (sTNFR)(Girardin *et al.*, 1992), el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) (Fischer *et al.*, 1992), el TFG $\beta$  (Ayala *et al.*, 1993; Marie *et al.*, 1996), prostaglandinas (PG-E2), hormonas como catecolaminas y glucocorticoides (Ramer-Quinn *et al.*, 1997; Salicru *et al.*, 2007), aparecen para contrarrestar los efectos pro-inflamatorios e inactivar el sistema de coagulación y suprimir la activación del NF-k $\beta$  inducidos durante la fase temprana hiperdinámica, con el fin de restaurar la homeostasis del organismo(Bone, 1996; Munford y Pugin, 2001; Riedemann, 2004; Mayer *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha observado que una liberación exacerbada de dichos mediadores con niveles elevados en sangre, son el reflejo de un peor pronóstico de la enfermedad. De hecho, si la sepsis progresa, la producción de radicales de oxígeno, la activación de las células inmunitarias quimiotaxis y la producción de citoquinas disminuyen (Laszlo *et al.*, 2004). Observaciones han demostrado que el plasma de pacientes con sepsis tienen la

capacidad de inhibir las funciones de leucocitos, lo que conduce a un tipo de inmunosupresión que no se entienden todavía completamente (Cavaillon, 2002; Laszlo *et al.*, 2004; Sunhra y Lopez-Collazo, 2009). Diferentes términos se han utilizado para definir estos eventos anti-inflamatorios: anergia (Dawson *et al.*, 1982), inmunodepresión (Angele y Faist, 2002), inmunoparálisis (Volk *et al.*, 2007). Sin embargo, considerando las diferentes propiedades alteradas de las células inmunitarias en pacientes con sepsis y SIRS no infecciosos, un término más adecuado para referirse a estos eventos es la denominación de **CARS** o "*síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensatoria*", definido por Bone en los años noventa (Bone *et al.*, 1997). Es este un concepto que acuña la idea de un fenómeno de reprogramación leucocitaria más que un defecto global del estado inmunitario. La respuesta exacerbada de CARS, contribuye a la supresión inmunitaria que se produce en pacientes con sepsis (Hotchkiss y Karl, 2003). Estos cambios que se producen durante esta fase hipodinámica de la sepsis, también viene acompañada por la disminución del gasto cardíaco, la frecuencia cardíaca y la resistencia vascular periférica (Laszlo y Ward, 2004; Mayer *et al.*, 2013).

Numerosos estudios han confirmado el estado inmunitario alterado de pacientes con SIRS y sepsis, el cual ha sido evaluado tanto en ensayos *in vivo*, como *in vitro* (Adib-Conquy *et al.*, 2009). Precisamente, la alta susceptibilidad de los pacientes en cuidados intensivos a las infecciones hospitalarias ha sido asociada con esa alteración del estado inmunitario (Volk *et al.*, 1996; Heagy *et al.*, 2000). Así, si bien la respuesta anti-inflamatoria es un componente esencial para restaurar la homeostasis inmunitaria, tras un estímulo inflamatorio como lo es una infección, un estado anti-inflamatorio exacerbado como el que se observa en etapas avanzadas de la sepsis, puede resultar eventualmente en una inmunosupresión y

conducir a la muerte del paciente debido a la incapacidad de resolver infecciones secundarias en períodos post sépticos (Bone, 1996; Hotchkiss *et al.*, 2009).



**Figura 8. Fases de la respuesta inflamatoria durante la sepsis.** Infección (a) activación de la respuesta inmunitaria (b) liberación de mediadores pro-inflamatorios (c) fase hiperdinámica o hiperactiva, signos clínicos de sepsis (d) liberación de mediadores anti-inflamatorios (e) sepsis grave o shock séptico (f). (PMN) neutrófilos polimorfonucleares, (ROS) especies reactivas del oxígeno y (NO) óxido nítrico (Laszlo y Ward, 2004).

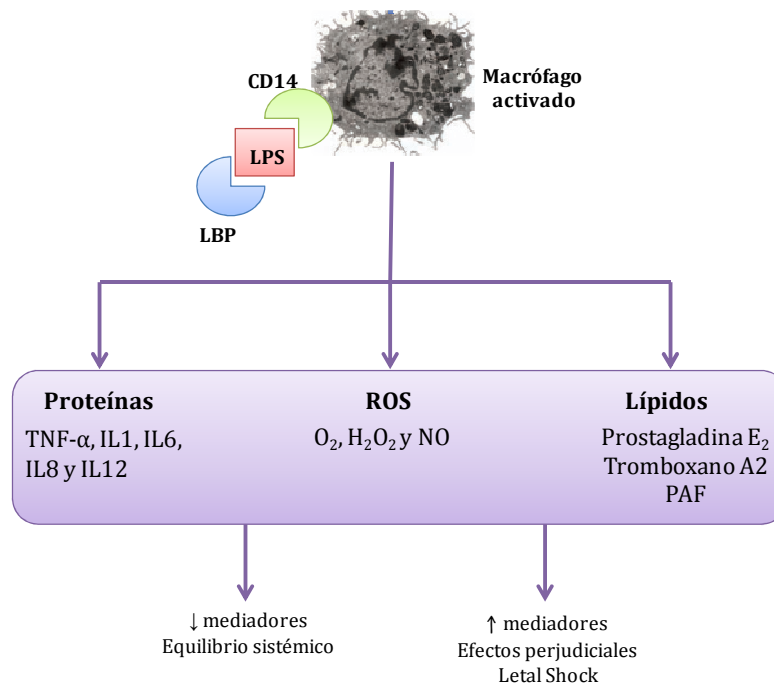
### 1.5.3 Shock endotóxico y el sistema inmunitario

El sistema inmunitario innato constituye el primer mecanismo de defensa del organismo frente a los patógenos microbianos (Abbas *et al.*, 2003). Las células de este sistema, tales como macrófagos/monocitos, células dendríticas y leucocitos polimorfonucleares (PMN), responden a través "Patrones de reconocimiento de receptores" (PPRs) expresados en la superficie celular (Nathan, 2002; Foster y Medzhitov, 2009). Esas células al ser activadas por el LPS, producen ROS y otros agentes microbicidas (lisozima, proteínas catiónicas, hidrolasas ácidas y lactoferrina) y secretan mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis



tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, factor activador de plaquetas (PAF), eicosanoides, anafilotoxinas, y derivados del complemento C3a y C5a (Figura 9) (Bochud y Calandra, 2003). Algunos de estos mediadores inflamatorios atraen PMN desde la circulación y los activan, favoreciendo su extravasación al aumentar la vasodilatación y la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, y en leucocitos (Ingalls *et al.*, 1998; Tapping *et al.*, 2000, López-Bojorquez *et al.*, 2004). A su vez, los PMN reaccionan a éste estímulo tras la adherencia al endotelio y diapédesis con la producción de mediadores inflamatorios como, leucotrienos B<sub>4</sub>, FAP (Tapping *et al.*, 2000). Los PMN activados expresan CD14, CD11/CD18, y varios receptores del complemento y receptores para la porción Fc de la IgG y por lo tanto, están más capacitados para reconocer y fagocitar LPS, fragmentos bacterianos y bacterias completas. Además, producen una serie de agentes microbicidas, como lisozima, proteína inductora de permeabilidad/bactericida (PIP), enzimas y ROS. Estos agentes son usados para la muerte y destrucción de los microorganismos. No obstante, si la activación de los PMN es elevada y por la presencia de altas concentraciones de estímulo infeccioso, pueden dar lugar a una liberación de agentes microbicidas que dañen los endotelios (Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro., 2001).

El inicio de este mecanismo acción de la respuesta inmunitaria innata, es a través de los Toll-Like-Receptors (TLRs), receptores PPRs de señalización transmembrana que constan de un dominio extracelular y un dominio intracelular. La familia de receptores TLRs consta de más de diez componentes descritos en el ser humano, de los cuales, solo siete interactúan con agentes bacterianos, de que los más importantes son el TLR-4, el TLR-2, el TLR-5 y el TLR-9 (Male *et al.*, 2007).



**Figura 9.** Activación de macrófagos por la endotoxina (Imagen adaptada de Lugowski, 1995).

En ratas y ratones se conocen al menos unos 12 TLRs funcionales (Lewis *et al.*, 2012). Dichos receptores reconocen las estructuras llamadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs), que incluyen endotoxinas (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipopeptidos, flagelinas y ARN viral (Lewis *et al.*, 2012). Los LPS liberados por las bacterias Gram negativas son transportados por una proteína denominada “*lipopolysaccharide binding protein*” (LBP) de 70 kDa, cuya síntesis en hepatocitos se induce por LPS y presenta una elevada especificidad de unión al lípido A, es transportada por lipoproteínas de alta densidad (HDL) y se encuentra en el plasma en concentraciones de ng/ml (Oberholzer *et al.*, 2001; Levels *et al.*, 2003). La LBP favorece la transferencia de monómeros de LPS bien a la CD14 soluble (sCD14), o bien a la correspondiente proteína de membrana ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (mCD14). Son glicoproteínas de importante papel en la respuesta leucocitaria y un receptor en

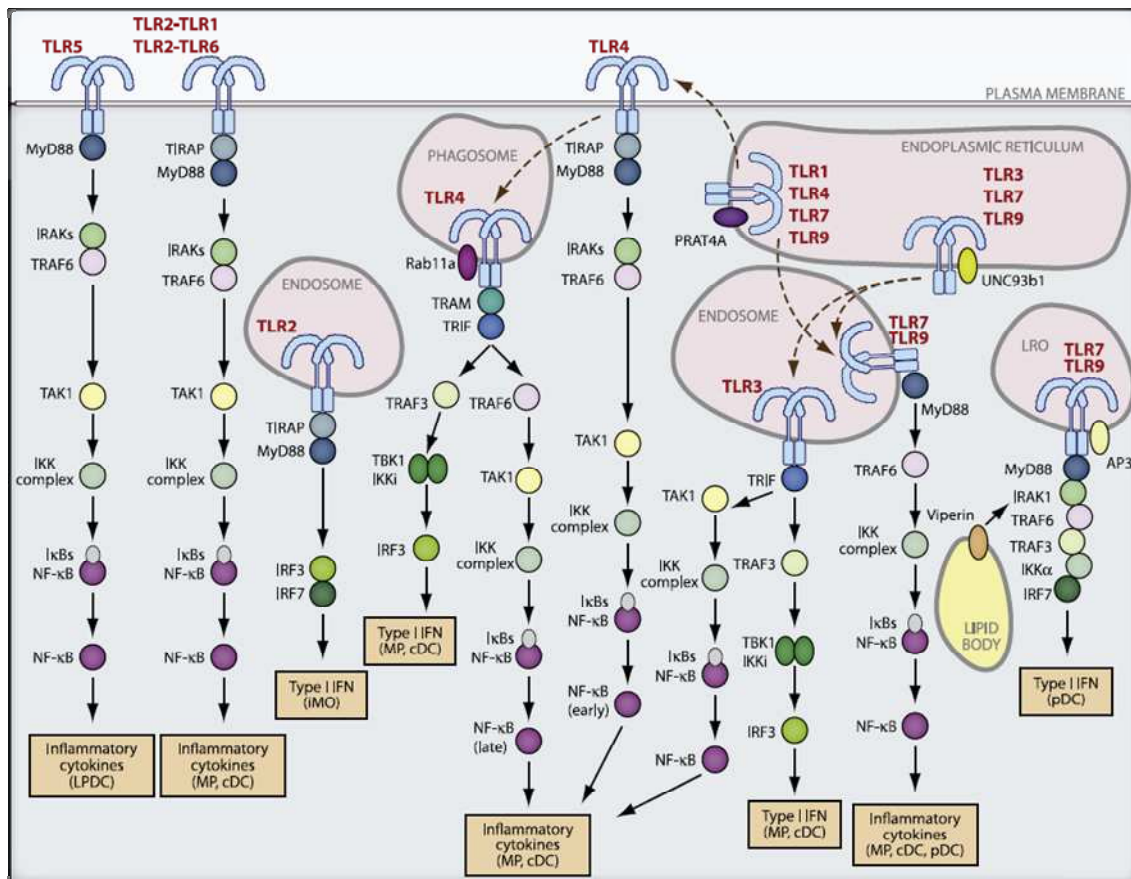
monocitos, macrófagos, Linfocitos B, células mamarias y trofoblastos (Antal-Szalmás, 2000). Los complejos CD14-LPS se disocian del LPB, para permitir su unión al dominio extracelular del receptor de reconocimiento Toll-Like-Receptor 4 (TLR-4), ensamblado a la “*myeloid differentiation protein 2*” (MD-2). Esta proteína es pequeña y soluble al carecer de dominio transmembrana, pero es encontrada sobre la superficie celular en asociación con un dominio extracelular del TLR-4 (Shimazu *et al.*, 1999), habiéndose comprobado que establece uniones directas con el LPS independientemente del CD14 o LPS-LPB, lo que sugiere un papel específico en el reconocimiento del LPS que podría contribuir a la modulación de la respuesta pro-inflamatoria de las células efectoras (Opal y Huber, 2002; Bochud y Calandra, 2003).

El TLR-4, principal PPR involucrado en la detección de bacterias Gram negativas (O'Neill y Bowie, 2007) e identificado originalmente en *Drosophila* (Hashimoto *et al.*, 1988), está presente en células presentadoras de antígenos (APCs) tales como macrófagos y células dendríticas (Blasius y Beutler, 2010). La activación de TLR-4, promueve vías de señalización intracelular que desencadenan una cascada de señales utilizando dos proteínas adaptadoras: MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) y TICAM1/TRIF (*TIR domain- containig adaptor inducing IFN- $\beta$* ), que inician dos vías de señalización MyD88-dependiente y MyD88-independiente, (Figura 10) (Akira, 2009; Lewis *et al.*, 2012).

La señalización mediante el MyD88 dispara una cascada de mecanismos involucrando procesos de reclutamiento de las quinasas IRAK-1 e IRAK-4 (*IL-1 receptor-associated kinases*) permitiendo la activación de esta última que promueve la fosforilación y subsiguiente activación de IRAK-1. La activación de IRAK-1 promueve su disociación del complejo receptor permitiendo su interacción

con nuevas proteínas adaptadoras como TRAF-6 (*TNF receptor-activated factor 6*). TRAF-6 dispara las vías de las MAPKs pudiendo de esta manera activar la vía del factor de transcripción AP-1. Por otro lado, la vía MAPKs, promueve la activación del complejo de kinasas inhibidor de I $\kappa$ B (IKK) que conducen a la degradación, por mecanismos de fosforilación y ubiquitinación, del factor inhibidor I $\kappa$ -B $\alpha$ , permitiendo la activación y la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que posteriormente facilita la transcripción de diversas citoquinas inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y IL-12p70, responsables de la respuesta sistémica inflamatoria durante el shock endotóxico (Riedemann y Ward, 2003; Fujihara *et al.*, 2003; Bochud y Calandra, 2006; Kim *et al.*, 2007; O'Neill y Bowie, 2007).

La cascada de señalización a través del TRIF conduce a la activación de los factores de transcripción IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) y STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*), los cuales a su vez inducen la expresión del gen de IFN- $\beta$  y de genes inducibles por interferón como las quimioquinas CCL5 y CXCL10 y la expresión de iNOS (Gao *et al.*, 1998; Weinstein *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2012). Sin embargo, existe una comunicación entre ambas vías y se ha propuesto que la señalización vía TLR4/MyD88 se asocia con una actividad en etapas tempranas del factor NF- $\kappa$ B y de la vía de las MAPKs, mientras que la vía TLR4/TRIF parece estar relacionada con la actividad transcripcional tardía del NF- $\kappa$ B y MAPKs (Yamamoto y Hemmi, 2003).



**Figura 10.** Cascada de señalización a través de la activación TLR-4 por la endotoxina.

Las bacterias Gram positivas tienen, por su parte, dos mecanismos de acción: A) producción de exotoxinas que se unen a moléculas del MHC-II de células presentadoras de antígeno (APCs) y a cadenas V $\beta$  de receptores de células T, activando un gran número de células T para producir cantidades masivas de citoquinas pro-inflamatorias (es el caso de enterotoxinas estafilococicas, toxina-1 del síndrome de shock tóxico y exotoxinas pirogénicas del estreptococo), y B) estimulación de la respuesta inmunitaria innata a través de mecanismos similares a los identificados en la sepsis por Gram negativos, es este caso se involucra a los Toll-Like-Receptors 2 (TLR-2), que han demostrado mediar respuestas celulares contra bacterias Gram positivas, y sus estructuras celulares (peptidoglicano, lipoproteínas, ácido lipoteicoico y modulina fenol-soluble) (Smithies y Weaver,

2004). Cuando un receptor de reconocimiento se une a una de esas estructuras, activa varias vías de señalización que implican factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B, AP-1, Fos y Jun (Sherwood, 2002; Bochud y Calandra, 2003).

Un componente del sistema inmunitario innato que actúa como un potente protector contra la invasión de patógenos es el sistema del complemento. Este sistema tiene tres vías de activación diferentes: 1) clásica, 2) alternativa y 3) la vía de unión a lectina. Las tres vías convergen en el factor de complemento C3 y conducen a la síntesis de productos de escisión, C3a, C3b, C5a, C5b y C5b-C9 o al complejo de ataque a la membrana (MAC). El sistema del complemento desempeña un papel importante en el desarrollo de sepsis y en el síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) (de Boer *et al.*, 1993; Nakae *et al.*, 1994; Fierl *et al.*, 2006). La vía clásica es activada por complejos antígeno-anticuerpo (Müller-Eberhard, 1988), pero también puede hacerlo por la proteína C reactiva (PCR), proteínas virales, proteínas beta amiloides, polianiones (Lipopolisacáridos bacterianos, ADN y ARN), así como fragmentos mitocondriales y células apoptóticas (Barrington *et al.*, 2001; Gasque, 2004; Thurman y Holers, 2006). La vía alternativa entra en acción mediante el reconocimiento de azúcares de la superficie y las moléculas de endotoxina de las bacterias, proteína A, proteína C-reativa (PCR), y los tejidos dañados (Reid y Porter, 1988; Müller-Eberhard, 1988; Gasque, 2004; Ganter *et al.*, 2007). Una serie de estudios han puesto en manifiesto el papel importante de la vía alternativa del complemento, en la contribución de la respuesta innata en la patogénesis de la sepsis, en comparación de la vía clásica (Dahlke *et al.*, 2011). La vía de lectina fijadora de manosa, también reconoce oligosacáridos de bacterias Gram-negativas o lipopolisacáridos (LPS) para activarse (Fujita, 2002). Así, se ha demostrando que la región antígeno-O de LPS activa la ruta del complemento a

través de esta vía y contribuye en la letalidad de la sepsis (Zhao *et al.*, 2002; Joanelle *et al.*, 2007).

El sistema del complemento junto con los TLRs se integran y consiguen rápidamente activarse en respuesta a agentes patógenos o a sus componentes (LPS, PGN microbiana, etc) (Ricklin *et al.*, 2010), e inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, etc), a través de C3aR y especialmente de C5aR (CD88), provocando una respuesta inflamatoria exacerbada durante la sepsis (Zhang *et al.*, 2007, 2007a). Por ejemplo, ratones knockout C5aR y C5L2, tienen una tasa de supervivencia mejor en comparación con el tipo salvaje en sepsis inducida (Rittirsch *et al.*, 2008, 2008a). También se ha demostrado un vínculo entre C5L2 y HMG-B1 "*High Mobility Group Box1 Protein*", ya que la liberación de HMG-B1 de las células que mueren durante la sepsis requiere la participación activa de C5L2. Mientras que, la unión de C5a a C5AR conduce a la liberación de factor de inhibición de la migración (MIF) de los fagocitos (Riedemann *et al.*, 2004), C5a activa las células endoteliales e induce la expresión de moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, etc) causando vasodilatación (Schumacher *et al.*, 1991). Además, aumenta la cascada de coagulación, contribuyendo de este modo a la coagulación intravascular diseminada, que aparece durante la patogénesis de la sepsis, favoreciendo también la miocardiopatía propia de los pacientes con sepsis (Muhlfelder *et al.*, 1979; Carson *et al.*, 1990; Ikeda *et al.*, 1997; Hirsh *et al.*, 2008).

Por otro lado, dado que la respuesta inmunitaria innata y adquirida forman un sistema integrado de defensa del huésped, en el cual numerosas células y moléculas funcionan conjuntamente, la respuesta inespecífica temprana es un factor de suma importancia, al influir en el tipo de respuesta específica que se

desarrollará subsecuentemente (Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro, 2001). Los fagocitos mononucleares son primordiales en esas interacciones. Durante la inmunidad innata los macrófagos, fagocitan y procesan los antígenos, activando las mismas como células presentadoras a los linfocitos T helper (CD4+), hecho que realizan a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II que expresan en su membrana y una serie de moléculas co-estimuladoras. De esta manera, los macrófagos y las células T CD4+ activadas liberan ciertos tipos de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ , IL-1RA, IL-13 y otras citoquinas, caracterizando una respuesta tipo Th2, inhibiendo así la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Wang *et al.*, 2001; López-Bojorquez *et al.*, 2004). Por lo tanto, la interrelación entre la inmunidad innata y la específica es bidireccional y está mediada en gran parte por las citoquinas (Hotchkiss y Karl, 2003). Esta respuesta Th2, viene acompañada de apoptosis de un gran número de linfocitos, por lo que podría conducir en la susceptibilidad de la infección (Ma *et al.*, 2008). Múltiples vías apoptóticas parecen estar involucradas en las sepsis, ya que durante la misma aumenta las proteínas pro-apoptóticas (BIM) y las anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL) en las células T (Weber *et al.*, 2008). La apoptosis de las células T puede afectar la respuesta inmune innata, al generarse una disminución del INF- $\gamma$  e IL-17, en las primeras 24 horas, una reducción de la fagocitosis, de la producción IL-10, así como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). La muerte celular en la respuesta inmunitaria adaptativa es beneficiosa en el organismo si es regulada. Si por el contrario, hay una pérdida excesiva de las células inmunitarias podrían comprometer la respuesta del organismo en para eliminar los patógenos, indicando que una incrementada apoptosis en linfocitos T, conllevaría a una estado más



comprometido de la sepsis (Yong-Ming *et al.*, 2015). Todos estos acontecimientos inducidos por la acción de las células inmunitarias activadas y los efectos de sus mediadores inflamatorios son los causantes de síntomas como fiebre, daño endotelial, derrame capilar, dilatación vascular periférica, desordenes en la coagulación, microtrombos y depresión miocárdica, que puede resultar finalmente en un MODS, shock y muerte del individuo (Van Amersfoort, 2003; Djillali *et al.*, 2005).

Es importante indicar el papel relevante que cumple el **NF-kB** durante el proceso de shock endotóxico. El factor de transcripción NF-kB regula la expresión de un gran número de citoquinas pro-inflamatorias involucradas en la patogénesis de la inflamación. Este factor participa en dos eventos de gran transcendencia: 1) la activación de Mo/Mø para una rápida producción de las citoquinas inflamatorias, y 2) la activación masiva de células endoteliales (López-Bojorquez *et al.*, 2004). El NF-kB está constituido por 2 subunidades de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas de *transactivación* Rel (p65, p50, c-rel, relB and p52), que han sido indentificadas en mamíferos (López-Bojorquez *et al.*, 2004) y puede expresarse como un heterodímero p65/p50, que es la forma activa del factor, o bien como un homodímero p50/p50, su forma inactiva (Karin y Lin, 2002). La conformación de homodímeros carece del dominio de transactivación, y por consiguiente no promueve la transcripción. Así, la sobreexpresión de homodímeros p50/p50 ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de genes pro-inflamatorios compitiendo con los heterodímeros p65/p50 por las regiones promotoras. Por otro lado, la activación y regulación de este factor de transcripción se encuentra rigurosamente controlada por un grupo de proteínas inhibitorias Iκ-B (IκBα, IκBβ y IκBε), las cuales mantienen los dímeros del NF-kB

en el citoplasma, bloqueando la translocación nuclear (Hayden y Ghosh, 2008). Las consecuencias de la activación del factor NF- $\kappa$ B pueden ser diferentes dependiendo del contexto en el cual está siendo activada su conformación (hetero u homodímero). Los heterodímeros p65/p50 del factor NF- $\kappa$ B promueven la expresión de genes pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1  $\alpha$ ; MIP-2; MCP-1), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selección, P-selectina, MAdCAM-1), inmunorreceptores, enzimas como iNOS, la ciclooxygenasa (COX)-2, fosfolipasa A<sub>2</sub>, lipoxigenasa (5-LO), y las proteínas de fase aguda (Baeuerle *et al.*, 1997; Pahl, 1999; Brown y Jones, 2004) durante la inflamación temprana, estando implicados en la fisiopatología del shock endotóxico (Liu y Malik, 2006). Por su parte, la predominancia de homodímeros p50/p50 de NF- $\kappa$ B durante el fenómeno de tolerancia ha sido asociado no solo a la inhibición de la expresión de estos genes pro-inflamatorios sino que además, se ha demostrado que dicha conformación promueve la expresión de genes que codifican para mediadores anti-inflamatorios como ser TGF- $\beta$ , IL-10 y COX2 (Lawrence *et al.*, 2001). Así, la inhibición *in vivo* de NF- $\kappa$ B reduce la expresión de múltiples citoquinas pro-inflamatorias y otras moléculas que juegan un papel crítico en la fisiopatología de la sepsis (Figura 11) (Liu y Malik, 2006). Un bloqueo del NF- $\kappa$ B, parece corregir todas las alteraciones típicas del shock séptico (disfunción cardiovascular, hipotermia, taquipnea, taquicardia, edema pulmonar, etc), lo que podría indicar que el eje central de la gravedad de la sepsis es la activación del NF- $\kappa$ B (López-Bojórquez, 2004; Liu y Malik, 2006).

En línea con lo todo lo descrito, diversas investigaciones han aportado los efectos del shock endotóxico sobre las funciones propias de las células

inmunitarias (monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos) (Seling *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 2004), a través de modelos con shock endotóxico y perforación con ligadura cecal (CLP), con resultados contradictorios, en aumentos o disminuciones de las funciones inmunitarias (capacidad fagocítica, quimiotaxis, linfoproliferación, Nk, etc) (Wenisch *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2006; Cavassani *et al.*, 2010; Dejager *et al.*, 2011). Una de las primeras funciones que manifiesta modificaciones es la adherencia, etapa importante para la extravasación o diapédesis de las células inmunitarias, resultados obtenidos en ratones de diversas cepas mostraron un aumento de esta capacidad, tras una endotoxemia (Victor *et al.*, 1998; Victor y De la Fuente, 2000; Victor *et al.*, 2002). De hecho, algunos estudios confieren este aumento de adherencia, debido a la creciente aparición del receptor CD18 en la superficie de los fagocitos, estimulados por la producción incrementada del TNF $\alpha$  y MIF (McCourt *et al.*, 2001; Calandra, 2000). La quimiotaxis y la fagocitosis, procesos sucesivos tras la adherencia, han manifestado una inhibición de su capacidad funcional de migrar y fagocitar en modelos de animales con shock séptico irreversible (Victor *et al.*, 1998; Victor y De la Fuente, 2000) y en neutrófilos de pacientes con shock séptico letal (Alves-Filho *et al.*, 2006, 2008; Kovach y Standiford, 2012). Sin embargo, en modelos con endotoxemia reversible muestran una recuperación de estas funciones (Victor *et al.*, 2002). No obstante, en estudios de peces con shock séptico, también se ha observado una fagocitosis reforzada e incrementada (Jang *et al.*, 1995; Neuman y Belosevic, 1996; Sarmiento *et al.*, 2004; Kozinska y Guz, 2004). Asimismo, se observó en cerdos con CLP con una respuesta fagocítica incrementada (Simms *et al.*, 1990). En contraste en un modelo ovino, mostró un declive de la fagocitosis (Regel *et al.*, 1987), mientras que otros estudios en ratas y humanos no muestran cambios en la función fagocítica en

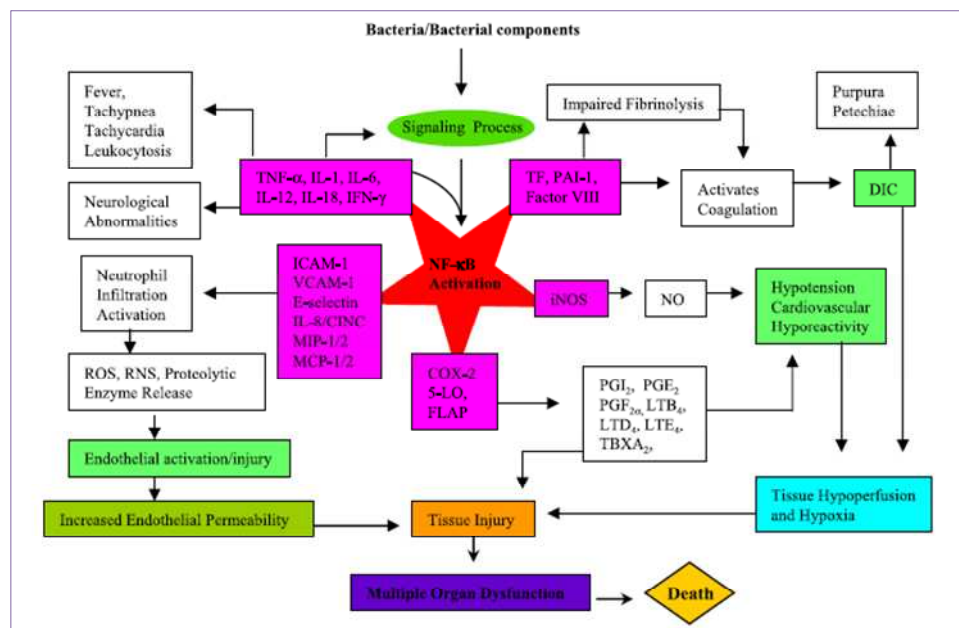
leucocitos polimornucleares (Territo y Golde, 1976; Spitzer et al., 1994). Algunos grupos de investigación han sugerido, que la activación excesiva de los fagocitos y células dendríticas, podría conllevar a un incremento de su capacidad de funcional (fagocitar) en la etapa temprana del shock endotóxico (Scumpia *et al.*, 2005; Sirgo *et al.*, 2010). Además, se ha reportado una importante eliminación de células dendríticas esplénicas y alteraciones en su funcionalidad durante el shock séptico (Hotchkiss *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2004). Sin embargo, como la sepsis generalmente progresa, da como resultado un deterioro de la fagocitosis y quimiotaxis (Ward, 2010; Delano *et al.*, 2011). Recientes evidencias sugieren, que en humanos como en animales de experimentación que hayan superado un cuadro de sepsis, poseen defectos a largo plazo de estas funciones (quimiotaxis y fagocitosis), estas observaciones conducen a considerar la sepsis no como un cuadro agudo, sino crónico que se podría ver reflejado en meses o años más tarde (Cavassani *et al.*, 2010; Angus, 2010; Delano *et al.*, 2011).

Otras de las aproximaciones para observar cómo se producen esos cambios funcionales, es la respuesta proliferativa y la actividad natural killer, en estudios realizados en leucocitos peritoneales de animales de experimentación y en células mononucleares de sangre periférica humana, se exhibió un aumento de la linfoproliferación espontánea (Haller *et al.*, 2000; Victor y De la Fuente, 2003). Otro estudio en células de hepáticas se observó el papel regulador del TLR4, con un incremento en la proliferación estimulada con LPS (Hsiao *et al.*, 2015), El LPS estimula la liberación de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-2 y IL1 $\beta$ ) que favorecen la linfoproliferación (Mathew y Sharma, 2000). Además, en ensayos clínicos y con animales de experimentación, se ha señalado que existe una relación directa de los niveles plasmáticos de citoquinas y la severidad de la sepsis. Así, valores elevados

de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 y disminuidas de IL-1 e IL-2, se correlacionan con una mayor gravedad de la enfermedad (Guidot, 1996; Abraham *et al.*, 1998). Por su parte, la mayor actividad natural killer (NK) detectada en un modelo experimental de ratones (Victor y De la Fuente, 2003) podría ser debido al aumento de la liberación de IL-2 y TNF $\alpha$ , puesto a que éstas citoquinas también se encuentran involucradas en dicha actividad (Karahashi y Amano 2000; Goodier y Londei, 2000). En estudios realizados en pacientes con sepsis, arrojaron un incremento en proporción de células NK (iNKT), elucidando la importancia de esta actividad en los pacientes con shock séptico (Heffernan *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2015) y en modelos experimentales (Heffernan *et al.*, 2013).

La sepsis ya no puede ser caracterizada simplemente como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica asociado con una infección. Sería más adecuado considerar que los pacientes con sepsis adquieren fenotipos inmune heterogéneos con un desequilibrio inmunológico que varía no solo de individuo a individuo, sino durante el curso de la enfermedad dentro de cada individuo (Volk *et al.*, 1996).

La naturaleza del estímulo infeccioso en sí mismo, la composición genética, factores exógenos como, por ejemplo, medicamentos, transfusiones de sangre, entre otros varían la respuesta inmunitaria frente a una sepsis, aquí radica la dificultad de encontrar estrategias terapéuticas adecuadas y eficaces (Villar *et al.*, 2004; Arcaroli *et al.*, 2005). Lo más adecuado sería conseguir estrategias que mejoren o aumenten su función inmune permitiendo restaurar una respuesta inflamatoria adecuada a fin de evitar el desarrollo de infecciones secundarias que pueden conducir, eventualmente, en la muerte del paciente (Villar *et al.*, 2004; Arcaroli *et al.*, 2005).



**Figura 11. Papel del NF- $\kappa$ B en la fisiopatología del shock séptico.** Componentes bacterianos que activan las diversas vías de señalización del NF- $\kappa$ B, que conducen a: 1) expresión de las citoquinas pro-inflamatorias como: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL-6, IL12 e IL-18, que causan fiebre, anomalías neurológicas y lo más importante reactivan el NF- $\kappa$ B, amplificando la respuesta inflamatoria; 2) expresión del factor tisular (TF), factor VIII, y el inhibidor de plasminógeno tipo 1 (PAI-1), induciendo coagulación intravascular diseminada (DIC); 3) expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), producción excesiva del óxido nítrico (NO), y las prostaglandinas vasodilatadoras, lo que resulta en hipotensión sistémica, contractibilidad cardíaca y hiporreactividad vascular; 4) expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina) y citoquinas (IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)1/2, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)1/2, citoquina quimioatrayente inductora de neutrófilos (CNIC)), dando lugar a la infiltración y activación de los neutrófilos, liberación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), enzimas preteolíticas, que causan lesión endotelial microvascular, aumento de la permeabilidad endotelial y lesión múltiple de órganos; 5) expresión de COX-2, 5-lipoxigenasa (5-LO), proteína de activación de la 5-LO (FLAP), que conducen a la producción de prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) y tromboxano A<sub>2</sub> (TBXA<sub>2</sub>), que causan el daño tisular (Liu y Malik, 2006).

#### 1.5.4 Shock endotóxico y el sistema nervioso y endocrino

La sepsis es una de las condiciones de estrés hallada tanto en seres humanos como en animales (Khardori y Castillo, 2012), y ante la misma el organismo involucra una compleja interacción organizada y coherente entre el sistema inmune y el sistema nervioso (SNC y SNP) (Sharshar *et al.*, 2005; Choong, 2012). De hecho, los vertebrados están dotados de dos sistemas de rápido

reconocimiento ante las amenazas y la movilización de las defensas: A) el sistema inmunitario innato, como se ha mencionado anteriormente, activando mecanismos celulares y humorales, y B) El sistema nervioso central (SNC), que reconoce las amenazas con una respuesta activa fisiológica para la supervivencia de los organismos (Munford y Tracey, 2002). Hay evidencias que indican que en episodios de sepsis y en otras condiciones inflamatorias, las respuestas inmunitarias, están reguladas por el sistema nervioso periférico autónomo (SNA), que incluye al sistema nervioso simpático y parasimpático (SNS y SNP, respectivamente) (Figura 12).

La compresión de esta relación del SN con la sepsis, viene dada gracias a los trabajos de Tracey y colaboradores, que han definido este hecho con el termino de “reflejo anti-inflamatorio o vía colinérgica inflamatoria” (Andersson, y Tracey, 2012).

Así, el SNA regula la producción de citoquinas a través de los neurotransmisores que libera, como es el caso de la norepinefrina que podría incrementar los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , etc) (Lang *et al.*, 2008). De hecho, los receptores adrenérgicos (ARs), participan activamente en una gran variedad de condiciones inflamatorias en pulmones, complicaciones que aparecen con un cuadro de sepsis, acompañado de complicaciones de lesión pulmonar aguda (ALI) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (Pierracos *et al.*, 2012; Matthay *et al.*, 2012). Es sabido que una excesiva actividad del SNS con una exacerbada liberación de noradrenalina, puede conducir a una disfunción cardíaca, inflamación hepática y un desequilibrio metabólico (Kaye *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 2000; Briest *et al.*, 2001; Aninat *et al.*, 2008), efectos que también tienen lugar durante la sepsis. Hay

evidencias de la acción de las citoquinas pro-inflamatorias en la excitación simpática durante el shock séptico (Gaillard *et al.*, 2003). Se ha demostrado que TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , actúan sobre las células endoteliales para inducir la actividad de la ciclooxigenasa-2, lo que lleva a la producción de la prostaglandina E2 (PGE2), que cruza la barrera cerebral, y así pueden activar la actividad nerviosa simpática (Elmqvist *et al.*, 1997; MacNeil *et al.*, 1997; May *et al.*, 2012). Por ello, hay estrategias para reducir la producción de catecolaminas durante el shock séptico, para facilitar la supervivencia del paciente (Schimittinger *et al.*, 2009). Una prueba de esto es el tratamiento con grelina, (un amino-ácido-28 péptidos), que reduce significativamente los niveles de noradrenalina y TNF $\alpha$ , mejoró la supervivencia en un modelo de sepsis en rata inducida LCP (Wu *et al.*, 2007, 2007a). También, la grelina tiene una acción central para estimular actividad vagal eferente, la cual reduce la frecuencia cardíaca, indicando que en la sepsis puede utilizar esta vía para alcanzar un equilibrio a nivel de SNS y SNP (Shimizu *et al.*, 2011).

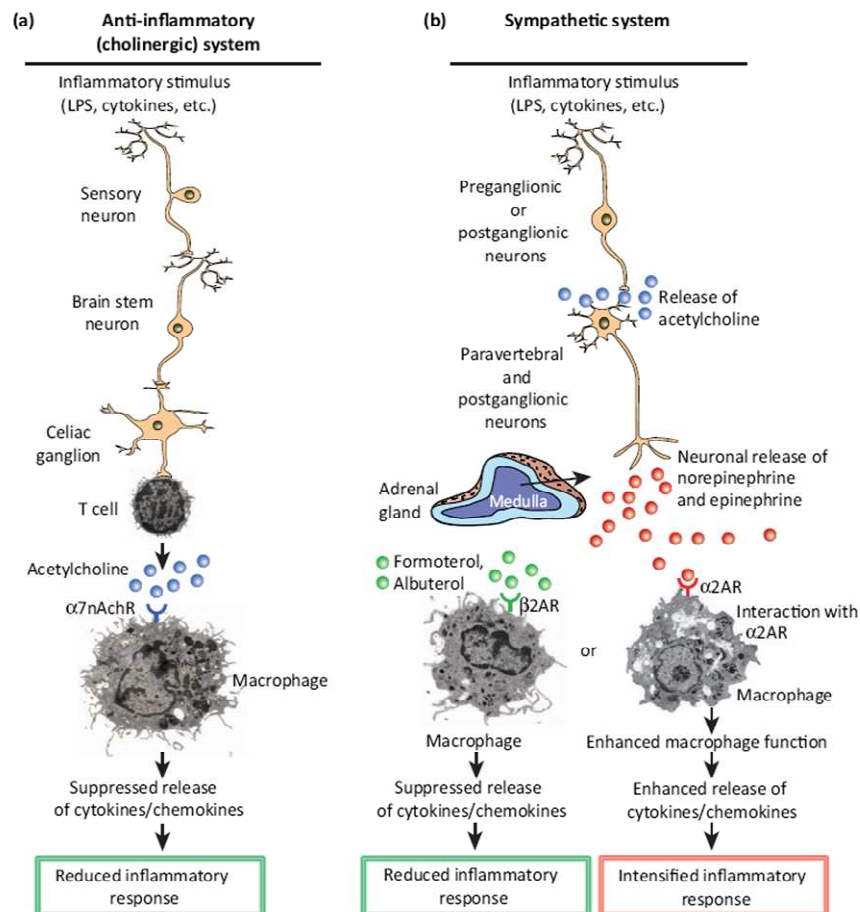
Por otro lado, se ha comprobado que durante la sepsis el reflejo neural que involucra el nervio vago, hace que las células T estimulen la liberación de acetilcolina (ACh), que interactúa con el receptor  $\alpha 7$ nACh en macrófagos para debilitar la liberación de mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$  y el HMGB-1 (Stojanovich *et al.*, 2007; Borovikova *et al.*, 2000; Bossman y Ward, 2013). De este modo, se ha observado que al inducir experimentalmente la activación de la vía colinérgica anti-inflamatoria, por una directa estimulación eléctrica del nervio vago eferente, tiene lugar una inhibición de la síntesis de TNF en bazo, hígado y corazón durante la endotoxemia (Bernik *et al.*, 2002).

El eje *hipotálamo-hipófisis-adrenal* (HHA), es la principal estructura neuroendocrina involucrada en la modulación de la respuesta adaptativa a



situaciones de estrés. El eje se inicia con la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el hipotálamo, que en la hipófisis media la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Weismüller *et al.*, 2010). EL último paso de este eje HHA, es la secreción de cortisol desde el cortex suprarrenal, la cual es por lo general proporcional a la gravedad del estrés generado por la sepsis (Khardori y Castillo, 2012). Las funciones principales son incrementar el nivel de glucosa en sangre a través de la gluconeogénesis, suprimir el sistema inmunológico y ayudar al metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos (Bondy, 1980).

Además, interviene en el mantenimiento vascular, inhibición de óxido nítrico sintasa, prostaglandinas y protaciclina, para la preservación de la perfusión de los órganos (Katan y Chris-Crain, 2010; Khardori y Castillo, 2012). Durante un cuadro de shock séptico, la respuesta del eje HHA, consiste en la liberación de cortisol desde la corteza suprarrenal (Choong, 2012). De hecho, el eje HHA es activado por citoquinas proinflamatorias (Weismüller *et al.*, 2010). No obstante, si la condición séptica persiste provoca un desgaste de la activación del eje, lo que conllevaría a una insuficiencia suprarrenal permanente en pacientes críticos (Cooper *et al.*, 2003). Una liberación a largo plazo de cortisol conlleva a daños en la células del hipocampo (Marck *et al.*, 2009). La alteración de eje HHA durante la sepsis es generada por mecanismos complejos multifactoriales (Choong, 2012).



**Figura 12. Papel de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático en la sepsis.** (A) El SNP, también se conoce como el sistema colinérgico, actúa a través del nervio vago para liberar acetilcolina de las células T, y (B) El SNS, con la función de los receptores adrenérgicos (AR) (Bosmann y Ward, 2013).

Una hormona principal neurohipofisiaria que se estimula ante un estrés en la *vasopresina* (AVP), también conocida como hormona antidiurética. Una vez liberada en la circulación ejerce su efecto periférico a través de tres receptores V1a (responsable de la vasoconstricción arterial), V1b (receptor expresado en la glándula hipofisaria anterior y en el hipocampo, y su activación libera ACTH) y V2 (encontrado en el conducto colector renal, media el efecto antidiurético) (Morgenthaler *et al.*, 2008; Katan y Chris-Crain, 2010; Rusell, 2011). Se ha observado que en fases tempranas de la instauración de la sepsis, tiene lugar una

rápida y masiva de AVP, la cual es mediada por citoquinas y productos bacterianos como el LPS (Wilson *et al.*, 1981; Rusell, 2011).

Las citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-1 $\beta$ ) y el LPS aumentan la liberación de otra hormona como la *leptina*, la cual tiene receptores expresados en el cerebro (hipotálamo), además en tejidos periféricos (páncreas, hígado, tejido adiposo y células inmunitarias como neutrófilos, monocitos, macrófagos, células B y T). Durante la sepsis, tras la estimulación del ARNm de leptina por los mediadores pro-inflamatorios, los niveles de esta hormona aumentan, hecho que se correlacionan con la severidad de la sepsis y podría tener un papel relevante en la sepsis asociada a MODS (Lam y Lu, 2007; Shapiro *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2010; Paz-Filho *et al.*, 2012). Se ha comprobado una correlación positiva entre la leptina y los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$ , en pacientes con sepsis. Además, la leptina modula la respuesta inmunitaria innata y adaptativa hacia un fenotipo Th1 caracterizado por la secreción de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Lam y Lu, 2007; Yousef *et al.*, 2010).

El eje *hipotálamo-hipófisis-tiroides* también se deteriora mostrando una disminución de la concentración total de T3 (disminución de la conversión periférica de tiroxina (T4) en T3 mediante la reducción actividad 5'-deiodinase) (Angelousi *et al.*, 2011) y de T4 por una disminución de la globulina fijadora de tiroxina y su afinidad de unión al aumentar la gravedad de la enfermedad (Khardori y Castillo, 2012). En estos hechos parecen participar diversas citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) directamente o indirectamente, activando también esas citoquinas de secreción de TRH, la cual disminuyen (Angelousi *et al.*, 2011; Khardori y Castillo, 2012; Sharma *et al.*, 2013).

### **1.5.5. Shock endotóxico y envejecimiento.**

Es interesante destacar que en los últimos años, la presencia de pacientes de edad avanzada en las unidades de cuidados intensivos (UCI), ha aumentado a nivel mundial (Marik, 2006), siendo también elevado la incidencia de sepsis en estos pacientes. (Angus *et al.*, 2001; Martin, 2006). Así, la incidencia de la sepsis grave en los pacientes de más edad, fue 26,2 casos por cada 1000 habitantes (Angus *et al.*, 2001; Martin, 2006).

Además, en un futuro próximo, las personas de edad avanzada crecerá más rápidamente, y para el 2050 la población anciana del mundo superará los grupos etarios más jóvenes (World Population Aging, 2001). Por tal motivo, se ha estimado el estudio de la sepsis en esta población con un mayor interés, ya que es una causa importante de morbilidad y mortalidad en las personas de edad avanzada. De hecho, las tasas de mortalidad asociadas a sepsis severa también aumentan con la edad (Ely *et al.*, 2003; Nasa *et al.*, 2011). Por ello resulta un desafío, avanzar en todo aquello que permita mejorar los cuadros de shock séptico y sepsis en estos pacientes (Prashant *et al.*, 2012).

El riesgo de sepsis en los acianos puede ser debido a las co-morbilidades crónicas como: el cáncer, diabetes y obesidad. Sin embargo, también podemos encontrar otra serie de factores que puede favorecer a la susceptibilidad, tales como: desnutrición, desequilibrio endocrino (hipotiroidismo, hipoadrenalismo e hipogonadismo) y la vejez en sí, como un factor de riesgo (por su fácil disponibilidad de padecer infecciones en el hogar de ancianos, hospitalización e intervenciones recurrentes, cateterismos urinarios, pobre estado funcional y el consumo de múltiples medicamentos). Además, las personas mayores tienen mayor riesgo de colonización por organismos gram-negativos, que pueden ser

resistentes a múltiples fármacos, y predisponen a los ancianos a la sepsis (Valenti *et al.*, 1978; Brun-Buisson *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 2001).

Es importante recordar que el sistema inmune sufre una inmunosenescencia al avanzar la edad, como se ha descrito en un apartado anterior. La fisiopatología de esta inmunosenescencia es compleja y multifactorial, y encontramos deficiencias funcionales tanto en la inmunidad celular y humoral con la edad (Opal *et al.*, 2005; De la Fuente, 2009). Este deterioro inmunitario predispone a que la tasa de estados más graves de sepsis, sea elevada en las personas mayores. Además, al envejecer nos encontramos con una respuesta anormal de citoquinas del tipo Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-10) (Sandmand *et al.*, 2002), que predispone a los ancianos a infecciones sistémicas pro-inflamatorias generalmente más prolongadas en comparación con los pacientes más jóvenes (Prashant *et al.*, 2012). Muchos de los cuadros de infartos asociados a sepsis, podría ser debido a varios factores, incluyendo TNF, el óxido nítrico (NO), y probablemente otras citoquinas inflamatorias como la IL-1 e IL-6 que tienen un efecto inotrópico negativo (Kumar *et al.*, 1996).

El defecto más notable en el envejecimiento, es la pérdida progresiva de las células “vírgenes” o “naive” tanto CD4 como especialmente CD8, que son la que responden a los nuevos antígenos. Esto perjudica la capacidad del sistema inmunitario adaptativo para defenderse ante la infección causada por patógenos microbianos en personas mayores (Franceschi *et al.*, 2000; Miller, 2000; Grubeck-Loebenstein y Wick, 2002). Por otro lado, ratones de edad avanzada sometidos a un tipo de endotoxemia, se ha observado una mayor expresión de PPRs tales como: TLR-4, MD2 y CD14, lo que puede explicar el exceso de riesgo de letalidad mediada por la endotoxina (Yamamoto *et al.*, 2002). Esa inmunosenescencia y el deterioro

de un red de citoquinas con una pobre inducción de mecanismos anti-inflamatorios que puedan contrarrestar a mediadores pro-inflamatorios tras el contacto con la endotoxina, podrían explicar la mayor letalidad del shock séptico en la vejez (Opal *et al.*, 2005; Prashant *et al.*, 2012). No obstante, hay una escasez de datos disponibles sobre la sepsis grave en personas de edad avanzada, debido a que tienden a excluirlos, porque generalmente se ha creído que pueden ser menos propensos a responder a un tratamiento y más proclives a sucumbir a la sepsis. Sin embargo, la población envejece y el número de casos va en aumento, por lo cual, en estudios futuros este grupo de edad, debe ser incluido (Opal *et al.*, 2005; Prashant *et al.*, 2012). La respuesta de los ancianos a endotoxinas también es más crítica por el exceso de respuesta de la epinefrina, retraso en la recuperación de la presión arterial e hipotensión (Saito *et al.*, 2001; Krabbe *et al.*, 2001; Rozemberg *et al.*, 2006). El impacto de la edad con la fisiopatología de la sepsis, se puede observar por ejemplo con la activación de la cascada de coagulación (Opal *et al.*, 2005). Con el envejecimiento hay un incremento en plasma de los niveles de fibrinógeno, factor VII, factor VIII y IX, lo que conlleva a un incremento de trombosis y tromboembolismo que aumenta durante la sepsis (Opal *et al.*, 2005; Prashant *et al.*, 2012).

#### **1.5.6. Los antioxidantes en el shock endotóxico**

Durante el *shock endotóxico* se incrementa la formación de radicales libres de oxígeno en la mayoría de las células del organismo, principalmente en las células fagocíticas. Aunque la liberación de estos compuestos es un mecanismo de defensa, también se producen, dependiendo sus niveles, daños oxidativos en biomoléculas durante la respuesta inflamatoria, los fagocitos activados generan

cantidades elevadas de ROS, y especies reactivas de nitrógeno (Van Berlo, 2010). Esto lo hacen a través de la activación de la NADPH oxidasa (NOX) concretamente de la NOX2 (Moore y MacKenzie, 2009; Lipinski, 2011; De la Fuente *et al.*, 2011; Vida *et al.*, 2014).

Como ya se indicado el shock endotóxico comprende una serie de eventos intracelulares que finalizan con la expresión génica alterada, y que conducen a la activación del NF-kB, la cual regula y está regulada por el estado redox de la célula (Wang *et al.*, 2002; Kabe *et al.*, 2005). Hay muchas evidencias experimentales que sitúan a las ROS y a las citoquinas pro-inflamatorias, como principales desencadenantes de un estrés oxidativo agudo responsable de la fisiopatología del shock endotóxico (Goode *et al.*, 1995; Víctor y De la Fuente, 2000; Víctor *et al.*, 2005, Bosmann y Ward, 2013). Durante los procesos de sepsis existen distintas fuentes potenciales de ROS, como la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, la activación de la xantina oxidasa, el estallido respiratorio asociado a la activación de las células inmunitarias y la activación del metabolismo del ácido araquidónico (Víctor *et al.*, 2005). Debido a la producción masiva de ROS, así como al deterioro de las defensas antioxidantes, se relaciona con la pérdida de la funcionalidad a nivel sistémico, que puede conducir a la muerte de los individuos con cuadros de sepsis (Böher *et al.*, 1997; Arnalich *et al.*, 2001). De hecho, en ensayos clínicos de sepsis, el uso glutamina (precursor de GSH) o selenio mejora los resultados clínicos y reduce la intensidad de la respuesta SIRS (Berger y Chiolerio, 2007), y en estudios con N-acetilcisteína (NAC) se observó mejora en roedores y pacientes con shock endotóxico, controlando la excesiva activación del NF-kB (Paterson *et al.*, 2000; Victor y De la Fuente, 2002), esto sugiere que puede haber una relación causa - efecto relación entre desequilibrio redox y la intensidad

de la respuesta SIRS, y otros eventos durante sepsis. Es conocido que el glutatión es un antioxidante intracelular de vital importancia para las funciones celulares, de hecho una reducción de mismo, conlleva a importantes alteraciones de la homeostasis del organismo (Arrigo, 1999; Morris *et al.*, 2014). Sin embargo, este antioxidante (GSH) no llega de forma eficaz a determinados órganos, por ello es importante la administración de precursores que permitan el aumento de sus niveles. Ensayos en sepsis, donde se utilizó la administración de antioxidantes (N-acetilcisteína,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C y selenio), dan como resultado una mejoría clínica y una respuesta atenuada de SIRS (Crimi *et al.*, 2006). En este contexto, la administración exógena de este tipo de compuestos podrían inducir en el aumento de las reservas de GSH, provocando así el retraso de determinados procesos asociados a situaciones de fuerte estrés oxidativo e inflamación como en el shock endotóxico letal (De la Flora *et al.*, 1991; Victor *et al.*, 2005), especialmente compuestos inmunomoduladores como N-acetilcisteína (NAC) o la tioprolina (TP) (Wlodeck *et al.*, 1993; Marthandan *et al.*, 2013). En nuestro grupo de investigación, se ha comprobado que la ingestión de NAC mejora el proceso fagocítico de macrófagos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos (Puerto *et al.*, 2002) y estimula la movilidad espontánea, la quimiotaxis y la respuesta proliferativa de linfocitos de ratones BALB/c (Pomaki *et al.*, 2005), así como de otros leucocitos (Guayerbas *et al.*, 2005) y funciones de macrófagos y linfocitos de modelos con shock endotóxico (Victor *et al.*, 1999; De la Fuente y Victor, 2000; Victor y De la Fuente, 2002). No obstante, los efectos de la TP en las células inmunitarias han sido poco estudiados. Sin embargo, se ha comprobado que la suplementación con este compuesto tiolico mejora las funciones de macrófagos y



linfocitos de roedores (Correa *et al.*, 1999; 1999a). Así como de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes (Pomaki *et al.*, 2005).

Por otra parte, durante la fase temprana de la sepsis existe evidencia de la activación excesiva de los fagocitos y otras células inmunitarias (como se comentó anteriormente: fase hiperdinámica), para contrarrestar la endotoxemia. Sin embargo, si la sepsis progresa, hay deterioro funcional progresivo de estas células (Scumpia *et al.*, 2005; Sirgo *et al.*, 2010; Ward, 2010; Delano *et al.*, 2011). La excesiva cantidad de radicales libres que se generan durante la sepsis son perjudiciales para las células y órganos y deteriora la capacidad de *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2) (Zakkar *et al.*, 2009), produciendo un desequilibrio en el sistema redox, favoreciendo una condición oxidante en individuos con sepsis (Kong *et al.*, 2011; MacGarvey *et al.*, 2012). Dado que, durante un estado normal del organismo, estas concentraciones de ROS son reguladas por una serie de enzimas antioxidantes inducibles tales como: NAD (P) H quinona oxidorreductasa-1, oxigenasas hemo, glutamato-cisteína ligasa, UDP-glucuronosiltransferasa y glutatión-S-transferasa (Zakkar *et al.*, 2009), la actividad Nrf2 se puede restaurar en individuos con sépsis por el uso de tales compuestos como antioxidantes, que evitan la acumulación de radicales libres (Zakkar *et al.*, 2009; Kensler *et al.*, 2010; Bell *et al.*, 2011).

En base a ello, surge la posibilidad de utilizar terapias de mejora del estado redox, con administración de compuestos que puedan atenuar el daño oxidativo que se observa durante la endotoxemia. Así encontramos diversos trabajos, donde la administración de compuestos antioxidantes como las vitaminas C y E, minerales como el cinc y selenio, la NAC, así como ácidos grasos omega-3, disminuyen el estrés oxidativo tras el contacto con la endotoxina aumentando la

funcionalidad de los sistemas afectados (Víctor y De la Fuente, 2002; Víctor y De la Fuente, 2003; Bulger y Maier, 2003; Leite *et al.*, 2005; Calder, 2004; Crimi *et al.*, 2006; Andrades *et al.*, 2011; VonDessauer *et al.*, 2011). Estos son algunos de los estudios que justifican la eficacia inmuno-estimulante, de diversos compuestos antioxidantes, que permiten así valorar la utilidad de los mismos con la suplementación de la dieta, en diversos estados donde encontramos un exceso de ROS, como es el caso del shock endotóxico.

## **1.6 El proceso de hormesis**

### **1.6.1 Concepto de hormesis**

Todos los sistemas vivos tienen capacidad intrínseca para responder, contrarrestar y adaptarse a algún tipo de estrés externo e interno (Rattan, 2008). Esta capacidad de resistencia al estrés ha pasado de ser un conjunto complejo de mecanismos moleculares de autodefensa (Landriscina *et al.*, 2009). El efecto del estrés en los organismos parece ser un proceso dependiente de la dosis; a estrés leve induce una tolerancia al mismo y amplía la esperanza de vida, mientras que el estrés excesivo exacerba el proceso de respuesta del organismo. Este fenómeno de la relación dosis-respuesta bifásica se denomina *hormesis* (1940) (Calabrese, 2002; Juhasz *et al.*, 2010). La hormesis (del griego hormaein –estimular–, del prefijo horm=hormona), fue definida como la respuesta bifásica en que ciertos agentes químicos y físicos afectan a los seres vivos: dosis bajas provocan efectos "favorables", dosis altas provocan efectos "adversos". El concepto evoluciona desde la toxicología. Paracelso (1493-1541), expresó que la toxicidad de cualquier sustancia dependía de la dosis, y notó que varias sustancias tóxicas podían ser beneficiosas en pequeñas cantidades. La naturaleza básica de este fenómeno sigue

siendo en gran parte desconocido (Vaiserman, 2010). Cuando se identificó por primera vez este fenómeno fue llamado "*ley de Schulz Arndt o Regla de Hueppe*", que indicaba la respuesta de la célula u organismo que a baja dosis de toxinas, se considera como un proceso de compensación adaptativa después de una perturbación inicial en la homeostasis (Stebbing, 1982). La definición que hoy se da de *hormesis* es: "proceso en el cual la exposición a bajas dosis de un agente químico o factor ambiental que es perjudicial a dosis más altas, induce como efecto adaptativo beneficioso sobre la célula u organismo" (Mattson, 2008). Si, los sistemas biológicos son deliberadamente expuestos a un estrés leve, sus vías homeodinámicas de mantenimiento y reparación son desafiadas y activadas, esto debería conducir al logro de efectos beneficiosos (*hormesis*), manifestado en salud y longevidad (Rattan, 2001, 2004a, 2005).

### **1.6.2 Las hormetinas y sus efectos**

Los efectos horméticos que han sido documentados en distintos organismos, se producen por varias combinaciones de factores que conllevarían a un estrés, estos factores son denominados "*hormetinas*". Una "*hormetina*" se define como cualquier condición que puede ser potencialmente hormética en términos fisiológicos, mediante la estimulación de una o más vías de respuesta al estrés (RS) dentro de una célula (Rattan y Demirovick, 2010). Dentro de las hormetinas se incluyen: frío, calor, hipergravedad, pesticidas, radiación ionizante, ejercicio físico y descargas eléctricas (Cypser, 2010). Así, la exposición de las células a un estrés térmico suave, puede protegerlas de un daño por estrés oxidativo o toxinas, tales como cianuro (Mattson, 2008). Las hormetinas se pueden clasificar en: (1) *hormetinas físicas*, tales como el ejercicio, el calor y la radiación, (2) *hormetinas*

*biológicas y nutricionales*, tales como infecciones, macronutrientes, especias y otras fuentes, y (3) *hormetinas fisiológicas* (Rattan y Demirovic, 2010). Muchas de esas hormetinas han demostrado generar efectos beneficiosos sobre la salud, cuando se utilizan en cantidades pequeñas, siendo tales potencialmente dañinas en dosis altas. Tales efectos suponen una ralentización del envejecimiento y/o prolongar la vida útil de las células y organismos (Rattan, 2008).

De todas las hormetinas posiblemente sea el ejercicio físico la más estudiada. De las principales vías moleculares implicadas en el logro de los efectos adaptativos y horméticos del *ejercicio*, son la activación de la cascada de señalización del NF-kB, que involucra diversas quinasas de estrés y genes antioxidantes (Ji, 2006). El ejercicio de baja intensidad también induce un aumento de la expresión de los niveles de factor de neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo, lo que se ha visto en roedores y que es seguido por un aumento de la estimulación cognitiva (Vaynman *et al.*, 2004; Arumugam *et al.*, 2006; Gómez-Pinilla, 2008). El ejercicio también aumentó significativamente la expresión de la proteína de desacoplamiento mitocondrial 2 (UCP2) (Kramer *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2006), regula enzimas antioxidantes y cantidad de HSPs (Kim *et al.*, 2015).

Por otro lado, un protocolo de baja intensidad de ejercicio con un entrenamiento de resistencia (EMRT), es capaz de inducir una adaptación celular permitiendo que sujetos ancianos sanos puedan hacer frente al estrés oxidativo (Ceci *et al.*, 2013). Los efectos beneficiosos del ejercicio en el control del estrés oxidativo y la función inmunitaria en la vejez, aunque no muy estudiados parecen evidentes (De la Fuente *et al.*, 2005; 2011). Sin embargo, los mecanismos

moleculares que median diferentes esas adaptaciones inducidas por el entrenamiento no se entienden completamente todavía (Kim *et al.*, 2015).

Una de las hormetinas que se ha utilizado con un objetivo específico para probar y aplicar hormesis, es el estrés causado por los cambios de temperatura, especialmente estrés por calor “*heat stress*” (HS). Los efectos del calor leve y severo, ha sido probados en la levadura, nematodos, moscas de la fruta, roedores y células humanas (Rattan, 2006). En un estudio de *Caenorhabditis elegans*, se observó una extensión de la esperanza de vida, de 1 y 2 horas a 35 °C (Cypser y Johnson, 2002). Interesantemente, los efectos beneficiosos del HS en *C. elegans*, sobre el tiempo de esperanza de vida, está relacionado con los niveles de expresión de las proteína de choque térmico “*heat shock protein*” (HSP) (Olsen *et al.*, 2006). En otro estudio, en moscas hembras jóvenes *Drosophila melanogaster*, la exposición de cuatro ciclos de HS leve a 34, incrementa el promedio máximo de esperanza de vida y potencia su resistencia al estrés por calor (Hercus *et al.*, 2003). Del mismo modo, machos vírgenes de líneas endogámicas de *D. melanogaster*, mostraron un aumento en el promedio de esperanza de vida y tasas más bajas de mortalidad durante varias semanas después de un tratamiento térmico de 36 °C durante 70 min (Khazaeli *et al.*, 1997; Rattan, 2008). En fibroblastos humanos, el efecto hormético por la exposición *in vitro* de pases seriados a 41°C durante 1 hora, dos veces a la semana durante todo su ciclo replicativo, incrementa el mantenimiento de su morfología juvenil, reduce la acumulación de daños oxidativos y proteínas glicosiladas, y además, aumenta la resistencia de estas células al peróxido de hidrógeno, etanol y la irradiación UV-A (Rattan, 1998; Verbeke *et al.*, 2001; Fonanger *et al.*, 2002; Demirovic *et al.*, 2014). Los posibles mecanismos de los efectos horméticos anteriores de HS leve en los fibroblastos

humanos, incluyen el aumento y mantenimiento de los niveles basales de algunas MAP quinasas, niveles de HSP y actividades de enzimas antioxidantes (Fonanger *et al.*, 2002; Beedholm *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2006). Asimismo, Rattan y Ali (2007), Observó en “*Normal Human Epidermal Keratinocytes*” (NHEK), sometidos a un HS leve mostraron resultados similares a los obtenidos en fibroblastos humanos. Otros estudios realizados por Rattan y sus colegas, han demostrado que los niveles basales de HSP70 inducible por estrés y proteínas HSP27 aumenta durante el envejecimiento celular en fibroblastos de piel humana (Fonanger *et al.*, 2002). Este exceso de proteínas chaperonas también fue observado en *D. melanogaster* y *C.elegans* estimulando su resistencia al estrés y prolongaron su esperanza de vida (Lithgow *et al.*, 1995; Tatar *et al.*, 1997). También se ha demostrado la importancia de las proteínas chaperonas durante tratamientos de RC, en la protección de las células nerviosas contra enfermedades relacionadas con la edad. Por ejemplo, los niveles de HSP70 y GRP78 se incrementan en las neuronas en cultivo *in vitro* e *in vivo*, y se correlaciona con la protección de las neuronas ante niveles letales de estrés oxidativo y metabólico como: ataques epilépticos graves, isquemia y neurotoxinas (Thiruma *et al.*, 2006). El factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1), promueve la transcripción de chaperonas importantes como la HSP70, que desempeñan un papel importante en acciones moduladoras de la RC sobre el factor NF-kB, proteína activadora- 1 (AP-1), y el factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1) (Mansoro, 2009).

En lo que respecta a los efectos de la *irradiación*, se ha comprobado que la radiación a bajas dosis (LDR), tiene efectos positivos sobre la salud (Liu, 2003). Las consecuencias a largo plazo de la hormesis por irradiación X (expuestas a 0,5 Gy y 0,75 Gy), en huevos machos de *Drosophila*, han demostrado un aumento de

longevidad (Vaiserman *et al.*, 2003). De la misma forma, otros estudios han reportado que los rayos gamma tienen los mismos efectos horméticos en la longevidad de ratas, ratones y conejillos de indias (Calabrese y Baldwin, 2000). Además, la radiación gamma a baja dosis en células embrionarias humanas y en los fibroblastos humanos de pulmón de embriones diploides MCR-5, (secuencialmente irradiados con 1 Gy de rayos gamma), aumenta la esperanza de vida replicativa hasta un 160% en comparación con las células no irradiadas (Holliday, 1991). La estimulación de la inmunidad por LDR también ha sido comprobada (Liu *et al.*, 1998, 2000, 2001). LDR actúa tanto en las APC y linfocitos T, para facilitar las reacciones intercelulares dentro de la sinapsis inmunológica formada entre estas dos células inmunes (Liu, 2003). Al mismo tiempo, estimula la expresión de B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), y secreción de moléculas como IL12p70 por los macrófagos, así como la expresión de TCR / CD3, CD4 y CD28 en los linfocitos y regula a la baja la síntesis de IL-10 por las células T junto con la supresión de la expresión de CTLA-4 (Liu, 2003). Otra vía de señalización que puede verse modulada por el efecto LDR, es la cascada cAMP / cGMP PKA (Liu *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Liu y Xie, 2000). En la actualidad, se ha demostrado que otras moléculas de señalización pueden verse estimuladas por LDR, como la p38MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno), que actúan conjuntamente con la fosfolipasa C (PLC) y la proteína quinasa C (PKC) (Shimizu *et al.*, 1999; Liu y Liu, 2002). La LDR activa la inmunidad antitumoral en ratón y aumenta la actividad antioxidante celular, y reduciendo la mutagénesis celular (Liu, 2003). Estas investigaciones demuestran, la utilidad para diseñar y realizar estudios destinados específicamente para probar el anti-envejecimiento, anti-cáncer y longevidad, a

través de la inducción de estrés por irradiación (Shimizu *et al.*, 1999; Liu y Liu, 2002; Liu, 2003).

Otra hormetina que ha resultado muy beneficiosa es *la restricción calórica* (RC) en el envejecimiento y la longevidad. Las dietas suponen un estrés leve y pueden modular cambios fisiológicos que permiten aumentar la esperanza de vida media, en una variedad de organismos, incluyendo hongos, insectos, ratas, ratones y monos (Kouda y Iki, 2010). Siendo este tema una cuestión muy debatida en la actualidad (Braekman *et al.*, 2006; Le Bourg y el Ratón, 2006). En base a las evidencias disponibles sobre la RC, la mayoría de los gerontólogos están de acuerdo con que la RC extiende la vida al disminuir la tasa metabólica y producción de oxidantes, y por tanto retrasa el envejecimiento al disminuir procesos de deterioro y/o mediante el aumento de la reparación y protección del organismo (Masoro, 2009). Así, la mortalidad se redujo significativamente en los animales que se han mantenido restricción energético-calórica de la dieta, en comparación con los animales control que consumen una dieta normal (Hall *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). La primera evidencia en roedores se reportó por McCay y sus colaboradores (1935), observaciones similares se han realizado en varias especies, incluyendo peces, gusanos, hongos y primates (Masoro, 2009). Conjuntamente, RC inhibe el desarrollo de enfermedades autoinmunes en varias cepas de ratones (Kubo *et al.*, 2002), y aumenta la resistencia a las neurotoxinas en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson (PD) y enfermedad de Alzheimer (AD) (Mattson *et al.*, 2003). Uno de los mecanismos horméticos que contribuyen los efectos beneficiosos de la RC es el aumento en la expresión del ARNm de SIRT1. SIRT1 es un regulador clave de muchas defensas celulares que permite la supervivencia en respuesta al estrés (Kouda y Iki, 2010). El aumento de la



longevidad inducida por RC en la levadura requiere la activación de Sir2p, el homólogo de SIRT1 de mamífero (Kouda y Iki, 2010). Otro estudio de restricción energética calórica, mostro aumentó de los niveles de HSP70 en células de hígado de ratas (Heydari *et al.*, 1993), y proteínas anti-apoptóticas HSP27 ampliando sus funciones de protección, además sugiere una posible respuesta hormética, durante los períodos transitorios de glucólisis en animales restringidos dietéticamente (Hipkiss, 2006).

Estudios realizados en roedores, han demostrado que la restricción calórica induce al aumento de la capacidad de defensa antioxidante (Ristow y Zarse, 2010). De la misma forma, se ha demostrado que la mayor abundancia de aminoácidos esenciales particularmente la metionina, contrarresta los efectos de radicales libres y extiende la esperanza de vida en *D. melanogaster* (Grandison *et al.*, 2009) y *C. elegans* (Meissner *et al.*, 2004).

Por otro lado, el hecho de que la terapia antioxidante a través de un restricción calórica, modula sobre la plasticidad sináptica y la cognición, ha llevado a la idea de que el estrés oxidativo es un factor intermedio para las actividades en el cerebro (Gómez-Pinilla, 2008). Los estudios indican que una dieta con RC o alimentación alterna con períodos de ayuno reduce los déficits en la función motora y cognitiva asociada con el envejecimiento, y la restricción dietética ha demostrado que protegen a las neuronas en ratones, ratas y monos contra diversas condiciones que inducen estrés oxidativo incluyendo la exposición a excitotoxinas y toxinas mitocondriales, y la expresión de genes mutados que provocaron la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington en humanos (Thiruma *et al.*, 2006). Nueva evidencia sugiere que por lo general moléculas implicadas en la plasticidad sináptica, como el factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), se ven afectados por el metabolismo de la energía celular. El efecto de RC eleva los niveles de BDNF mediando en el aumento de la neurogénesis del hipocampo (Lee *et al.*, 2002). Un número de estudios han demostrado que dietas ricas en anti-oxidante incrementan múltiples parámetros de la plasticidad sináptica del hipocampo, y estos parámetros correlacionados con mejoras en la memoria espacial. Por ejemplo, la vitamina E mejora la vida útil, la función mitocondrial, y la prueba de rendimiento neurológico en ratones viejos (Navarro *et al.*, 2005). Los efectos de los ácidos grasos omega 3 pertenecen a la familia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), estimulan el metabolismo celular mediante la modulación de genes mitocondriales y de la biogénesis y la reducción de los productos del metabolismo disfuncional al limitar el estrés oxidativo (Gomez- Pinilla, 2008). Estudios sobre *C. elegans*, han puesto de manifiesto que el extensión de la esperanza de vida, se acompaña de la resistencia al daño oxidativo, por el aumento de la superóxido dismutasa y enzimas catalasa, y una termotolerancia (Rattan, 2004b; Cysper *et al.*, 2006; Salminen *et al.*, 2010). Recientemente, Panowski y sus colegas han reportado, de que el factor de transcripción implicado en la extensión de la esperanza de vida en *C. elegans* es el Pha-4, miembro de la familia de Foxo. Asimismo, es de importancia en la extensión de la esperanza de vida en ratas y ratones con CR (Masoro, 2009).

Otros grupos de investigación, han abordado directamente las dianas moleculares de las isoflavonas en la dieta, con cultivos de células endoteliales y del músculo liso ROS, en la activación de vías de señalización intracelular vinculadas a la expresión génica antioxidante (Siow *et al.*, 2007; Siow, 2010). En estudios *in vivo* en modelos de roedores con isquemia, han demostrado que la dieta enriquecida con isoflavonas de soja actúan como neuroprotector (Burguete *et al.*, 2006; Siow,

2010) y en ratas ovariectomizadas reduce significativamente el tamaño del infarto cerebral tras la oclusión permanente de la arteria cerebral (Schreihöfer *et al.*, 2005). Una vía consiste en el factor de transcripción Nrf-2 que se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) de los genes que codifican las enzimas antioxidantes y citoprotectoras (Mattson, 2008). Por otro lado, el Nrf-2 ofrece protección contra el estrés oxidativo en el sistema cardiovascular y otros órganos (Lewis *et al.*, 2010), la regulación de CD36 por Nrf-2 puede ser un paso crítico en la progresión de la aterosclerosis. Un estudio sugiere que la dieta de soja inhibe el desarrollo de lesión aterosclerótica por mecanismos distintos de la reducción del colesterol sérico (Siow, 2010). Otros fitoquímicos pueden ejercer como moduladores horméticos al activar NFkB y CREB, en la inducción de genes que codifican factores de crecimiento y proteínas anti-apoptóticas (Mattson, 2008). Resultados de estudios epidemiológicos y ensayos de intervención en modelos animales, sugieren que las dietas ricas en fitoquímicos pueden mejorar la neuroplasticidad y la resistencia a la neurodegeneración (Murugaiyah y Mattson, 2015).

La prevalencia de los estudios horméticos de dosis-respuesta de toxinas ambientales ha sido revisada por Calabrese y Blain (2005). Las implicaciones de la hormesis mediada por toxinas, son importantes para la comprensión de la carcinogénesis y su prevención. Otros términos que se utilizan comúnmente para describir las respuestas de hormesis es pre-acondicionamiento o respuesta adaptativa al estrés (Mattson, 2008). Por ejemplo, centrándonos en las endotoxinas (LPS de *E.coli*), se conoce su papel en la respuesta inflamatoria y de oxidación generalizada, que dan como resultado un alta tasa de mortalidad en los organismos, donde los factores responsables de esos efectos son las células

inmunitarias y sus mecanismos de respuesta (Víctor *et al.*, 2004; Víctor *et al.*, 2005).

### **1.6.3 La hormesis y el shock endotóxico**

Muchas estrategias para sepsis se basaron en la atenuación de la respuesta inflamatoria, mediante el bloqueo de diferentes productos bacterianos como los lipopolisacáridos de membrana (LPS), utilizando anticuerpos anti-LPS, antagonistas de LPS, anti-lípido A, o bien bloqueando mediadores claves de la respuesta inflamatoria resultante como ser anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1, receptor soluble de TNF- $\alpha$ , inhibidores de la óxido nítrico sintetasa (iNOS)(Natason *et al.*, 1994; Opal y Croos, 1999), la proteína C (Van de Pool *et al.*, 2005) y GC en bajas dosis (Annane *et al.*, 2009). En línea con lo anterior, muchas adaptaciones fisiopatológicas que permiten regular la inflamación exacerbada sirven como un mecanismo esencial para la protección del huésped frente a un shock endotóxico. Uno de estos mecanismos claves de protección frente a este contexto es el fenómeno de tolerancia a endotoxina (Fan y Cook, 2004; Cavaillon y Adib-Conquy, 2006; Biswas *et al.*, 2007), en el cual las células o los organismos expuestos a dosis repetidas de endotoxinas entran en un estado de refractario transitorio incapaces de responder a una nueva exposición frente a estímulos inflamatorios. Dicho fenómeno es un estado de tolerancia inespecífica que en nada se asemeja a la tolerancia inmunológica específica de antígeno (Ziegler-Heitbrock, 1995). A mediados de los años 60 se observó que animales sometidos a una pre-exposición con bajas dosis de LPS, mostraron una mortalidad reducida (Berger, 1967). Así, el pre-tratamiento con endotoxina no solo reduce los factores involucrados en la respuesta frente a un estímulo con LPS, además reduce la mortalidad frente a una

dosis letal (Watson y Kim, 1963). Tantos estímulos pro-inflamatorios endógenos como exógenos e incluso efectos inflamatorios sistémicos de diferente origen como, por ejemplo, la injuria térmica o traumática, un shock hemorrágico o cualquier otro evento SIRS pueden conducir a este estado refractario (Zweifach *et al.*, 1957; Cavaillon, 1995). De manera paradójica, en ocasiones, este estado de protección puede asociarse clínicamente a un cuadro de inmunosupresión relacionado con una susceptibilidad aumentada a infecciones secundarias pudiendo concluir en la muerte del paciente (West y Heagy, 2002; Biswas *et al.*, 2007; Adib-Conquy y Cavaillon, 2009). Sin embargo, a pesar de haberse llevado múltiples ensayos clínicos (trials) con agentes anti-inflamatorios, no se ha conseguido aumentar la sobrevida de pacientes con sepsis y shock (Deans *et al.*, 2005; Hotchkiss *et al.*, 2009).

## *Justificación y objetivos*

---

## **2. Justificación y objetivos**

En base a los antecedentes indicados en la introducción de la presente tesis, el estudio llevado a cabo se ha desarrollado en el marco del envejecimiento entendido como un proceso biológico complejo, heterogéneo y multifactorial que conlleva el deterioro progresivo de las funciones del organismo y de manera relevante a las de los sistemas reguladores, el nervioso, endocrino y el inmunitario y la comunicación entre ellos, lo que supone un peor mantenimiento de la homeostasis, y consecuentemente, un aumento de morbilidad y mortalidad. Como ya se ha comentado, al avanzar la edad se tiene una mayor incidencia de infecciones, fenómenos autoinmunes y cánceres, lo que indica la presencia de un sistema inmunitario deficiente. Dado que este sistema es esencial para el mantenimiento de una adecuada salud, el profundizar en el conocimiento de los cambios que experimentan las células inmunitarias con el envejecimiento, lo que se conoce como “inmunosenescencia”, y como los mismos afectan a la capacidad de defensa frente a procesos infecciosos, resulta esencial para entender esa mayor incidencia de enfermedades en la vejez. Un hecho importante a tener en cuenta es que el envejecimiento no afecta del mismo modo a cada uno de los individuos de una población que ha nacido en una misma fecha, lo que dio lugar al concepto de “edad biológica”, más relevante que la edad cronológica para conocer la tasa de envejecimiento de cada individuo y, consecuentemente su esperanza de vida. Ante la dificultad de tener parámetros que nos permitan valorar la edad biológica de cada individuo, nuestro grupo de investigación ha propuesto y validado varias funciones inmunitarias como marcadores de dicha edad. Los individuos adultos que muestran valores de tales parámetros propios de una mayor edad tienen una menor longevidad que los de su misma edad que presentan valores apropiados a la

misma. Esto se ha comprobado de forma muy clara en el modelo en ratones con envejecimiento prematuro denominado como “PAM: prematurely ageing mice”. También, en ratones longevos y en personas centenarias hemos comprobado que esos parámetros se encuentran con valores propios de la edad adulta. Con estas herramientas, y sabiendo que conseguir una longevidad saludable depende en gran medida de factores de estilo de vida, resulta importante comprobar que estrategias pueden ser eficaces para retardar dicha tasa de envejecimiento y conseguir una más larga y saludable longevidad.

Actualmente, y a pesar de los diversos progresos obtenidos en la utilización de antibióticos, el shock endotóxico está asociado con un elevado índice de mortalidad. Las endotoxinas en general, y en particular los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, juegan un papel fundamental en el inicio de la respuesta inmunitaria frente a las infecciones de bacterias Gram negativas. Se asume en la actualidad que en esa respuesta inmunitaria, en la que se liberan una gran cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios para defenderse de los patógenos, la que, si no está bien regulada, causa el fallo multiorgánico que lleva a la muerte del individuo infectado. Al avanzar la edad aumenta la susceptibilidad a padecer infecciones, y parece ser menor la cantidad de agente infeccioso que se requiere para desencadenar un shock séptico letal. Este hecho podría relacionarse con los cambios que conlleva la inmunosenescencia, en la que tiene lugar un mayor y mal regulado estrés oxidativo e inflamatorio.

En ratones hembras ICR-CD1 jóvenes-adultas ya se habían comprobado una serie de cambios funcionales y del estado redox en las células inmunitarias peritoneales tras la administración de endotoxina (LPS) de *E.coli* en cantidades de



200 mg/kg, la cual es capaz de producir un shock endotóxico letal con un mortalidad del 100 % a las 36 horas de la administración. También, en unos estudios preliminares, se había observado que en esa cepa de ratones la cantidad de 50 mg/kg, en la edad madura, era suficiente para producir tal letalidad. No obstante, a nuestro conocimiento no se había estudiado cómo se modificaban las funciones y el estado de redox en células inmunitarias frente a un shock endotóxico, en ratones de diferentes edades. En este contexto, un hecho totalmente desconocido era si los animales que llegaban a longevos eran capaces de mantener una respuesta inmunitaria más apropiada que los viejos al shock endotóxico.

Como se ha comentado en la introducción las estrategias horméticas, se están introduciendo en las intervenciones para hacer más lento el proceso de envejecimiento. Un tratamiento con hormesis, utilizando como hormétina la administración de bajas dosis de LPS durante la edad adulta, podría permitir un rejuvenecimiento de la funcionalidad y estado redox de las células inmunitarias y mejorar su capacidad de respuesta a un shock endotóxico letal en la vejez, tanto en ratones cronológicamente viejos como en PAM.

Por otra parte, se ha comprobado que la ingestión de cantidades apropiadas de antioxidantes en la dieta, al actuar como inmunomoduladores, permite en individuos viejos recuperar el estado funcional y redox de las células inmunitarias propias de la edad adulta. En resultados previos del grupo se había comprobado que la N-acetil cisteína (NAC) y la tioprolina (TP), como antioxidantes aportadores de glutatión (GSH), permitían, al administrarse en la dieta, mejorar el estado funcional y disminuir el estrés oxidativo en células inmunitarias de ratones, aumentando su longevidad. También, la administración intraperitoneal de NAC en

ratones jóvenes con shock endotóxico letal mostraba resultados parecidos y aumentaba la supervivencia. No obstante, se desconoce el papel de la administración en la dieta de NAC y TP en individuos con shock endotóxico, y tampoco se sabe si el efecto de esa administración viene dependiendo de la edad de los animales.

Finalmente, dado que habíamos comprobado que, en ratones adultos, la supervivencia tras la administración de un shock endotóxico y las respuestas funcionales de las células inmunitarias variaban dependiendo de la cepa de ratones utilizada (ICR-CD1 versus BALB/c) y el sexo de los mismos, resultaba interesante analizar dichos cambios en ratones C57BL6/129, y tanto en machos como en hembras.

En base a lo indicado la hipótesis planteada fue:

*Los cambios en las funciones y estado redox de las células inmunitarias de ratones frente a la administración de una cantidad de endotoxina, y la supervivencia del animal, variarán según la edad cronológica y biológica del individuo. Las estrategias de hormesis y nutricionales (con antioxidantes administrados en la dieta) mejorarán tales funciones y supervivencia. Se darán variaciones dependiendo de la cepa y sexo utilizados.*

Para confirmar tal hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

***PRIMER Objetivo:***

Estudio de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 adultas, maduras,

viejas y longevas, así como su supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*.

***SEGUNDO Objetivo:***

Comparación de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 de edad madura, que sobrevivieron o murieron tras la administración de 50 mg/kg de LPS.

***TERCER Objetivo:***

Estudio del efecto de una estrategia de Hormesis basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones hembras ICR-CD1, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro, y tanto en animales sometidos a un shock endotóxico letal, por LPS de *E. coli*, en la vejez, como en los correspondientes controles.

***CUARTO Objetivo:***

Estudio del efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico por administración de LPS de *E.coli*.

***QUINTO Objetivo:***

Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Estudio de la supervivencia de ratones C57BL6/129, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.

## ***Materiales y métodos***

---

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Material biológico**

##### **3.1.1. Animales**

La experimentación se ha llevado a cabo en ratones (*Mus musculus*) hembras de la cepa ICR/CD1 procedentes de Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona), y en ratones hembras y machos de la cepa C57BL6/129, procedentes del animalario del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal del Instituto de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los animales fueron distribuidos en lotes de 8 por jaula (48cm x 23,5cm x 15cm), y mantenidos en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, en condiciones estándar de alimentación con pienso (A.04, PANLAB, Barcelona) y agua "ad libitum", a una temperatura de 22±2°C y fotoperíodo invertido de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (empezando a las 20:00 horas). En todos los experimentos, el manejo y tratamiento de los animales se llevó a cabo en base a lo dispuesto en el Real Decreto 223/1988 y la orden del 13 de Octubre de 1989, sobre "Normas de registro de los establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal, así como la autorización para el empleo de animales en experimentos". También se han respetado las "líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales", Anexo al artículo 5 de la Directiva del Consejo de 24 de Noviembre de 1986, (86/609/CEE), y del Real Decreto 1201/2005 del 21 de Octubre (BOE nº 252), sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

### **3.1.2. Línea celular**

En los ensayos de citotoxicidad se ha empleado como diana de los leucocitos la línea celular YAC-1, procedente de un linfoma murino de células T inducido por el virus de Moloney. Estas células se emplean para el ensayo de actividad “natural killer” (método descrito en el apartado 3.6.4.3). Se mantienen congeladas en crioviales estériles y en alícuotas de 2-3 millones de células/ml hasta su utilización.

### **3.2. Soluciones salinas y medios de cultivos**

**Solución salina tamponada de fosfatos (PBS).** La composición por litro fue: cloruro sódico 123,2 mM (NaCl, PANREAC), fosfato monopotásico 3,23 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, PANREAC) y agua miliQ (MILLIPORE). Se esterilizó en autoclave durante 60 minutos a 1 atmósfera de presión y 120° C de temperatura.

**Solución Hank's.** La composición por litro fue: D(+)- glucosa 5,55mM (PANREAC), cloruro magnésico 1mM (MgCl<sub>2</sub>, PANREAC), cloruro sódico 137 mM (NaCl, PANREAC), cloruro potásico 5,36 mM (KCl, PANREAC), cloruro cálcico 1,26 mM (CaCl<sub>2</sub>, PANREAC), fosfato magnésico 0,8 mM (MgHPO<sub>4</sub>, PANREAC), fosfato monopotásico 0,44 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, PANREAC), fosfato disódico 0,42 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PANREAC), bicarbonato sódico 4,16 mM (NaHCO<sub>3</sub>, PANREAC) y agua milliQ (MILLIPORE). Se esterilizo mediante filtración a través de una membrana de 0,22 µm de diámetro de poro (MILLIPORE).

**Medio completo.** Constituido por medio comercial estéril RPMI 1640 (1x) con HEPES y rojo fenol, enriquecido con L- Glutamina (LABORATORIOS PAA), 10% de suero fetal de ternera descomplementarizado en el baño a 56°C durante 30 minutos (GIBCO) y 1% de Gentamicina (10mg/ml,PAA) (GIBCO) como antibiótico.

**RPMI 1640 sin rojo fenol y con L-glutamina (PAA).** Se utiliza en aquellos ensayos en los que el rojo fenol interfiere con las mediciones espectrofotométricas de los parámetros de estudio.

Todos los medios y las soluciones una vez completada su esterilización, se almacenaron a 4º C hasta el momento de su utilización. Las condiciones de esterilidad se mantuvieron todo el tiempo en que se llevaron a cabo los experimentos.

### **3.3. Reactivos**

- Ácido clorhídrico (HCl) (PANREAC).
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido pícrico (PANREAC)
- Ácido tricloroacético (TCA) (PANREAC).
- Agua destilada (MILLIPORE).
- Agua ultrapura (MILLIPORE).
- Albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA-ALDRICH)
- Anticuerpo frente a CD3: Anti mouse conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Pharmingen)
- Anticuerpo frente a CD4: PE-Cy5 Anti mouse (L3T4) (H129.19) (BD Pharmingen)



- Anticuerpo frente a CD8: FICT Anti mouse CD8a (Ly-2) (53-6.7) (BD Pharmingen)
- Anticuerpo frente a CD11b: Mouse CD11b Conjugate FITC (CALTAG Laboratorios).
- Anticuerpo frente a CD19: Anti mouse conjugado con isotiocianato de fluoresceína FITC (BD Pharmingen).
- Anticuerpo frente a CD45RA: Anti mouse conjugado con ficoeritrina PE (Santa Cruz Biotechnology).
- Azida sódica (SIGMA-ALDRICH).
- Azul tripán, solución al 0,4%, estéril (SIGMA-ALDRICH).
- $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida ( $\beta$ -NADPH) (SIGMA-ALDRICH).
- Cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) (PANREAC).
- Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) (PANREAC).
- Cloruro de potasio (KCL) (PANREAC).
- Cloruro sódico (NaCL) (PANREAC).
- Concanavalina A (Con A) (SIGMA-ALDRICH), alicuotada a 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS estéril y almacenada a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de su utilización.
- Detergente NP-40 (solución al 10%) (FLUKA).
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (MERCK).
- Dioxano (MERCK).
- 5,5'-Ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) (SIGMA-ALDRICH).
- Eosina-azul de metileno (PANREAC).
- Etanol (PANREAC).
- Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (PANREAC).
- Fosfato magnésico ( $\text{MgHPO}_4$ ) (PANREAC).

- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (BDH CHEMICALS).
- Gentamicina (10 mg/ml, PAA) (GIBCO).
- Glutation reducido (GSH) (SIGMA-ALDRICH).
- Glutation reductasa (SIGMA-ALDRICH)
- Helio comprimido (Praxair).
- Hidroperóxido de cumeno (SIGMA-ALDRICH).
- Hidroperóxido de potasio (KOH) (MERCK).
- Histopaque de densidad 1,077 g/ml (Ficoll-Hypaque, SIGMA-ALDRICH). Medio separador de las células sanguíneas que se presenta en botellas de 100 ml y se conserva a 2-8 °C en oscuridad.
- Kit colorimétrico para valorar la actividad citotóxica de células NK (Cytotox 96, PROMEGA).
- Kit colorimétrico para valorar contenido proteico a través del ácido bicinconínico (BCA) (SIGMA-ALDRICH).
- Kit para la valoración de la actividad de la Xantina Oxidasa (Molecular Probes).
- Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (055:B5), alicuotado a 100µg/ml en PBS estéril y almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización (SIGMA-ALDRICH).
- Líquido de centelleo (Citoscint).
- Metanol (PANREAC).
- N-etilmaleimida (NEM) (SIGMA-ALDRICH).
- Nitroazul de tetrazolio (NBT) (SIGMA-ALDRICH), compuesto liofilizado, se reconstruye con solución de Hank en el momento de su utilización para obtener una concentración de 1 mg/ml. Se conserva a 4 °C protegiéndolo de la luz.
- Partículas de látex, de 1,1 µm de diámetro (SIGMA-ALDRICH), diluidas al 1% en medio Hank's estéril y conservadas a temperatura ambiente hasta su utilización.

- Péptido formilado (N-formil-Met-Leu-Phe: fMLP) de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH), reconstituido en medio salino PBS, alicuotado y conservado a -20°C hasta su utilización.
- Peróxido de hidrógeno al 35% (MERCK).
- PMA (Phorbol myristate acetate), a una concentración inicial de 200µg/ml diluido en agua: DMSO (1:3) y conservado a -20°C hasta su utilización (SIGMA-ALDRICH).
- Solución desinfectante para superficies Derquim DSF 11 (PANREAC).
- Suero fetal bovino (Foetal Calf Serum Standard Quality, PAA).
- Timidina tritiada (1mCi/ml) diluida en PBS estéril, con una actividad específica de 35Ci/mmol y almacenada a -4°C (BIOLINK S.A).

### **3.4. Aparatos y material de laboratorio**

- Agitadores (BUNSEN).
- Amasadora industrial (FORMEX).
- Autoclave (SELECTA).
- Balanza de precisión (SAUTER Y SARTORIUS).
- Baño termostatzado con agitación (Mettler).
- Bomba de filtración (MILLIPORE).
- Cabinas de flujo laminar vertical (TELSTAR AV-100, TELSTAR MICRO-H).
- Cámaras de Boyden (fabricadas en metacrilato. Constan de dos compartimentos, cuyas dimensiones son: 9 mm de diámetro interno, 13 mm de diámetro externo y 5 mm de altura) (Taller Facultad de CC Físicas, UCM).
- Campo abierto con pared (80 x 80 x 30 cm) (Taller Facultad de CC Físicas, UCM).
- Centrífuga onmífuga refrigerada (2.0 RS HERAEUS).
- Centrífuga modelo 5702R (EPPENDORF).

- Citómetro de flujo: FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson).
- Congelador de -20°C (LIEBHERR).
- Congelador de -80°C (HERAEUS).
- Contador  $\beta$  de centelleo (PERKIN-ELMER).
- Contador de células manual (REXEL).
- Cronómetros (STOPWATCH).
- Cubetas de cuarzo con 10 mm de paso óptico (STARNA).
- Cubetas de vidrio óptico con 10 mm de paso óptico (HELLMA).
- Cuerda de cáñamo (para la realización de las pruebas de conducta).
- Destilador de agua y agua ultrapura (MILLIPORE).
- Dispensador de hielo picado (SCOTSMAN).
- Espectrofotómetro (ESPECTRONICS GENESYS 5).
- Falcon de plástico (NUNC).
- Filtros de 0,22 $\mu$ m de poro para la esterilización de medios (MILLIPORE).
- Filtros de 102x256 mm para la recolección automática de células (12 well cell Harvesters, FilterMAT, Skatron Instruments).
- Filtros de nitrocelulosa transparentables de 13mm de diámetro y 3 $\mu$ m de poro, para los ensayos de capacidad quimiotáctica (MILLIPORE).
- "Flask" de cultivo (NUNC).
- Fluorímetro de placas (TECAN).
- Frigoríficos (FAGOR y LIEBHERR).
- Hemocitómetro de Neubauer (BLAU BRAND), para los recuentos celulares.
- Homogeneizador eléctrico con émbolo metálico, RW 16 Basic (IKA-Werke).
- Incubador termostatzado con incorporación de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad a saturación (KOWEL y HERAEUS).

- Jaulas para la estabulación de los animales (PANLAB).
- Laberinto en T (27 x 10 cm brazo corto; 64 x 10 cm brazo largo; 19 cm altura pared) (Taller Facultad de CC Físicas, UCM).
- Material de vidrio: tubos graduados, pipetas Pasteur, placas Petri, portaobjetos, vasos de precipitado, probetas, termómetros, etc.
- Material de plástico: jeringuillas desechables (con capacidad de 1, 5 y 10 ml), tubos eppendorf de 1,5 ml, crioviales de congelación de 2 ml, cubreobjetos, guantes, puntas de pipetas automáticas, etc.
- Material quirúrgico: pinzas, tijeras, etc (TALMED).
- Microfuga (Beckman Coulter).
- Microscopios ópticos (NIKON).
- Papel de filtro (ALBET).
- pH-metro con electrodo (CRISON).
- Pipetas automáticas y multidispensadoras (GILSON y BOECO).
- Placas M.I.F. de ocho pocillos (1,5cm de diámetro) para el ensayo de la fagocitosis (KARTELL).
- Placas transparentes multipocillo con fondo plano y fondo en U (NUNC).
- Sistema de vacío universal UVS400A (THERMO ELECTRON CORPORATION).
- Sonicador (BANDELIN SONOPULS).
- Tabla de madera (2,9 cm ancho, 80 cm longitud) para la realización de pruebas de conducta.
- Tablero de agujeros para ratón (60 x 60 x 45 cm) (Taller Facultad de CC Físicas, UCM).
- Videocámara (PANASONIC SDH-H40).
- Vórtex (BUNSEN).

La esterilización de material se efectúa en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 1 hora. Para el material que no puede ser sometido a autoclave (pipetas automáticas, columnas de adherencia, etc.), se emplea luz ultravioleta durante 20 minutos antes de la utilización del mismo.

### **3.5. Diseños Experimentales y métodos**

#### **3.5.1. Estudio de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras adultas, maduras, viejas y longevas, así como de la supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*.**

Para llevar a cabo este primer objetivo del trabajo, se utilizaron 64 ratones hembras de la cepa ICR-CD1 ex-reproductoras sanas adultas ( $36 \pm 2$  semanas de edad), maduras ( $52 \pm 2$  semanas de edad), viejas ( $84 \pm 2$  semanas de edad) y longevas ( $122 \pm 2$  semanas de edad). Los animales se adquirieron con  $25 \pm 2$  semanas de edad, y tras una semana de aclimatación en el animalario, estos ratones fueron marcados de forma individualizada mediante ácido pícrico. Se tuvieron los siguientes 8 grupos experimentales con 8 animales por cada grupo: A) Ratones Adultos con shock endotoxico; B) Ratones Adultos controles; C) Ratones maduros con shock endotoxico; D) Ratones maduros controles; E) Ratones viejos con shock endotoxico; F) Ratones viejos controles; G) Ratones longevos con shock endotoxico; y H) Ratones longevos controles.

A los ratones de los grupos con shock endotóxico se les provoco el mismo mediante la inyección intraperitoneal de 50 mg/kg (i.p) de lipopolisacarido (LPS) de *E. coli*. Esta dosis fue elegida tras diversas pruebas previas. Los animales de los grupos controles recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina (PBS).

Las muestras de estudio fueron leucocitos peritoneales, los cuales se obtuvieron sin necesidad del sacrificio del animal (ver apartado 3.6.3). Los ensayos funcionales fueron realizados con la muestra fresca. Los leucocitos fueron obtenidos a tiempo 0 horas (previo a la inyección de endotoxina), a las 2 horas y a las 24 horas, tras la inyección de la endotoxina, siempre a la misma hora y en la fase oscura de su ciclo vital (8.00-9.00 h). Inmediatamente, se procedió a la valoración de los siguientes parámetros de función inmunitaria: la capacidad quimiotáctica de los macrófagos y linfocitos, la movilidad espontánea de macrófagos y linfocitos, la fagocitosis y capacidad digestiva de los macrófagos, la linfoproliferación basal y en presencia de los mitógenos: concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS), y la actividad citotóxica antitumoral NK. Los parámetros de estado redox analizados fueron: los niveles de glutatión total y actividad de la enzima catalasa (CAT). También se identificaron y se cuantificaron diferentes subpoblaciones de la suspensión peritoneal (CD3/CD8, CD19/CD45RA y CD11b/CD45RA) mediante citometría de flujo. Además, se llevó a cabo el seguimiento de la hora de muerte de los individuos tras el shock endotóxico, lo que nos permitió realizar curvas de supervivencia de los grupos experimentales.

Por otro lado, se efectuó un diseño complementario para valorar la evolución de los parámetros de función y estrés oxidativo antes mencionados, en un grupo de 16 ratones hembras ICR-CD1 adultas (n=8) ex-reproductoras de 36±2 semanas de edad, y viejas (n=8) de 84±2 semanas de edad, que recibieron una dosis de la endotoxina de 100 y 25 mg/kg (i.p) de LPS, respectivamente.

**3.5.2. Estudiar las diferencias en las repuestas funcionales y estado redox de las células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras de edad madura, tras la administración de 50 mg/kg de LPS, en animales que sobrevivieron y no al shock endotóxico.**

Una vez valorado los cambios funcionales y del estado redox en los leucocitos peritoneales del diseño comentado (apartado 3.5.1), y al comprobar que en la edad madura había una respuesta heterogénea la dosis de 50 mg/kg, se llevo a cabo otro diseño experimental para estudiar en un mayor número de animales, los cambios en los parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo, de leucocitos peritoneales de ratonas ICR-CD1 maduras ex-reproductoras. Para ello, se utilizaron 15 animales de  $48 \pm 2$  semanas de edad, que fueron marcados de forma individualizada y mantenidos en grupos máximos de 5 individuos. Tras una semana de aclimatación, se les indujo un shock endotóxico mediante la inyección intraperitoneal de 50 mg/kg (i.p) de LPS de *E. coli*. A continuación, obtuvimos la suspensión peritoneal, para la valoración de diversos parámetros de función y estrés oxidativo, a tiempo 0 horas (antes de la endotóxina), a las 2 horas y a las 24 horas (tras la inyección de la endotóxina). Además, se contabilizó el tiempo de supervivencia de cada ratón, tras la administración de la endotoxina, pudiendo diferenciar el grupo de supervivientes de las que murieron en el plazo de  $62 \pm 6$  horas.

**3.5.3. Estudiar el efecto de una estrategia de *Hormesis* basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones ICR-CD1 hembras, sobre parámetros conductuales de los animales, así como**



**parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro. Esto se analizará tanto en animales controles como sometidas a un shock endotóxico letal, por LPS de *E. coli*, en la vejez.**

En este diseño experimental, se quiso comprobar el efecto de la aplicación de una “*hormetina*”, como es la administración de dosis bajas (0,1 mg/kg) de lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) de forma repetitiva, como se indicará más adelante. La generación de una “*hormesis*” permite un pre-acondicionamiento y la estimulación de los mecanismos de protección celular (Rattan, 2008). Se llevaron a cabo dos diseños experimentales:

**1.- Efecto del tratamiento hormético en ratonas cronológicamente maduras.** Se utilizaron 20 ratonas de la cepa ICR-CD1 vírgenes de  $55 \pm 2$  semanas de edad (maduras), que tras una semana de aclimatación en el animalario, fueron marcadas de forma individualizada y distribuidas en dos grupos: A) el grupo que recibió la hormetina (n=10) (0,1 mg/kg LPS) y B) el grupo control (n=10) que recibió solución salina (PBS). A la edad  $84 \pm 2$  semanas de edad (viejos), los animales fueron evaluados mediante una serie de pruebas conductuales (sensoriomotoras, capacidad exploratoria y ansiedad, descritas en el apartado 3.6.1). Una vez finalizado el estudio conductual se obtuvo la suspensión peritoneal en la que se efectuó la valoración de diversos parámetros de función y estrés oxidativo, obtención que fue realizada siempre a la misma hora y en la fase oscura de su ciclo vital (8.00-9.00 h). En paralelo se analizaron esos parámetros en un grupo control (n=10) de  $55 \pm 2$  semanas de edad (maduros).

***2.- Efecto del tratamiento hormético en ratonas maduras con envejecimiento***

***prematureo.*** Se utilizaron 120 ratonas ICR-CD1 vírgenes de  $50 \pm 2$  semanas de edad, las cuales fueron sometidas a la prueba de laberinto en T (ver apartado 3.6.2). Una vez clasificados los animales en NPAM (de las siglas en inglés “non prematurely aging mice”) y PAM (de las siglas en inglés de “prematurely aging mice”), y a una edad  $55 \pm 2$  semanas, se establecieron los siguientes 4 grupos experimentales: PAM control (n=8), PAM con hormesis (n=8), NPAM control (n=8) y NPAM con hormesis (n=8).

Tratamiento de hormesis: En los animales del subdiseño 1 y en los del subdiseño 2 clasificados en PAM y NPAM, la hormesis se estableció con inyecciones intraperitoneales de 0,1 mg/kg de LPS (como hormetina). Las inyecciones se realizaron entre las 08:00 a 9:00 h, durante cuatro sesiones separadas por intervalos de 15 días. El grupo control, recibió inyecciones intraperitoneales de solución salina (PBS).

Modelo de shock endotóxico: Una vez finalizado el tratamiento de hormesis a la edad de  $84 \pm 2$  semanas de edad (subgrupo experimental 2), fueron evaluados mediante una serie de pruebas conductuales (sensoriomotoras, capacidad exploratoria y ansiedad, descritas en el apartado 3.6.1). Una vez finalizado el estudio conductual se procedió a la provocación de un shock endotóxico mediante inyección intraperitoneal de 50 mg/kg (i.p) de lipopolisacarido de *E. coli* (055:B5, Sigma-Aldrich). Las inyecciones fueron realizadas a las 8:00 am horas. A continuación, se obtuvo la suspensión peritoneal, para la valoración de diversos parámetros de función y estrés oxidativo, a las 0 horas (antes de la endotóxina) y a las 2 y 24 horas tras la inyección de la endotóxina. Además, se recogió la mortalidad de cada ratón, para realizar las curvas de supervivencia.

**3.5.4. Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico.**

Se utilizaron 48 ratones hembras de la cepa ICR-CD1 ex-reproductoras sanas de  $30 \pm 2$  (adultas),  $80 \pm 2$  (viejas) y  $126 \pm 2$  (longevas) semanas de edad y tras una semana de aclimatación, fueron marcadas, pesadas de forma y distribuidas en los siguientes grupos experimentales, cada uno de ellos constituidos por 8 animales.

- A) Ratones Adultos con dieta enriquecida con antioxidantes (AA)
- B) Ratones Adultos con dieta control (AC)
- C) Ratones viejos con dieta enriquecida con antioxidantes (VA)
- D) Ratones viejos con dieta control (VC)
- E) Ratones longevos con dieta enriquecida con antioxidantes (LA)
- F) Ratones longevos con dieta control (LC)

Durante las 4 semanas de ingestión de la dieta suplementada con antioxidantes (grupos experimentales) o de dieta estándar (grupos controles), la ingesta del alimento fue medida semanalmente entre las 8:00 y 10:00 am, suministrándose 320 gramos de dieta (suplementada o estándar) por jaula. Tras una semana, el alimento no consumido fue recogido y pesado. El peso de cada animal fue determinado también cada semana, desde el inicio de la ingesta de las dietas. Transcurridas esas cuatro semanas de ingesta, a las  $35 \pm 2$ ,  $84 \pm 2$  y  $130 \pm 2$  semanas de edad (adultas, viejas y longevas respectivamente), se les indujo un shock endotóxico (50 mg/kg de lipopolisacarido (LPS) de *E.coli*, 055:B5, Sigma-

Aldrich). Posteriormente, obtuvimos la suspensión peritoneal, para la valoración de diversos parámetros de función y estrés oxidativo, a tiempo 0 horas (previo a la inyección de endotoxina), a las 2 horas y a las 24 horas, tras la inyección de la endotoxina, siempre a la misma hora y en la fase oscura de su ciclo vital (8.00-9.00 h). Al mismo tiempo, se contabilizó la mortalidad de cada ratón, para realizar las curvas de supervivencia.

#### Preparación de la Dieta: Fabricación de las galletas

Para llevar a cabo los tratamientos de suplementación en la dieta, se elaboraron unas galletas a partir de pienso en polvo estándar A04 (Panlab S.L. Barcelona) que se mezcló con dos antioxidantes tiólicos N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP) (ambos de Sigma-Aldrich) al 0,1%.

Galletas controles Se añadió 320 gramos de pienso estándar A04 (ver ficha técnica en anexos) en 240 ml de agua destilada, y se mezcló de forma homogénea con ayuda de una amasadora industrial. La mezcla así obtenida se extendió y subdividió en porciones de aproximadamente 8-10 cm<sup>2</sup>, para así facilitar su administración en las jaulas de los animales. Las bandejas con las galletas recién hechas (ver figura 13), se colocaron en el interior de una habitación oscura, en un ambiente fresco y seco, con el fin de conservarlas adecuadamente y mantener las propiedades de todos sus componentes. Las galletas se voltearon 2 veces al día para facilitar el proceso de secado. Una vez secas se guardaron en cámara fría y en envases opacos para evitar el paso de la luz, y se almacenaron, durante un periodo de tiempo no superior a 2 semanas, hasta el momento de su administración a los ratones.

Galletas enriquecidas con antioxidantes Se siguió el procedimiento anteriormente descrito, sin embargo al pienso estándar se incorporaron los antioxidantes tiólicos N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP) al 0,1% de cada compuesto y un 99.8% de pienso estándar A04.

**Figura 13. Galletas controles y enriquecidas con antioxidantes tiólicos N-acetilcisteína (NAC) y tioprolina (TP).**



**3.5.5. Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Así mismo, estudiar la supervivencia de estos ratones, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.**

Para llevar a cabo la primera parte de este diseño experimental, se utilizaron 27 ratones hembras y 18 machos de la cepa C57BL6/129 de  $84 \pm 2$  y  $88 \pm 2$  semanas de edad, respectivamente, cedidos por la Dra. Lydia Giménez-Llort (Unidad de Psicología Médica de la Universidad Autònoma de Barcelona). Tras la semana de aclimatación en el animalario, se provocó el shock endotoxico letal, mediante la inyección intraperitoneal de 50 mg/kg (i.p) de la endotoxina bacteriana (Lipopolisacárido, LPS, de *E. coli* 055:B5). Se obtuvo la suspensión peritoneal, para la valoración de los diversos parámetros de función y de estrés oxidativo, a tiempo 0 (previo a la administración de la endotoxina), a las 2 y a las 24 horas tras la inyección. Además, se

contabilizó el tiempo de supervivencia de cada animal, los que permitió realizar las curvas correspondientes.

La segunda parte del diseño, consistió en estudiar la supervivencia de ratones machos y hembras de esta misma cepa, que recibieron 25, 50, 100 y 150 mg/kg (i.p) de la endotoxina bacteriana (LPS), a las 28±2 (adultos), 48±2 (maduros), 72±2 (viejos) y 92±2 (longevos) semanas de edad.

### **3.6. Métodos**

#### **3.6.1. Pruebas conductuales**

Las pruebas conductuales se efectuaron en cuatro días consecutivos, siguiendo una secuencia de realización previamente establecida como idónea, para que la influencia de una prueba en la siguiente fuese la menor posible (Giménez-Llort *et al.*, 2002; Baeza *et al.*, 2010).

Durante el primer día se llevaron a cabo las pruebas de reflejos visual y de extensión posterior además de la prueba de la regla de madera o “wood rod test” y la prueba de la cuerda tirante. En estas pruebas se utilizó un fluorescente de luz roja como fuente de iluminación, al realizar las pruebas por la mañana y tener en cuenta el ciclo invertido de luz en el que se encontraban los ratones en el estabulario. En el segundo día se realizaron la prueba de neofobia o “Corner test” y la denominada prueba del campo abierto. El tercer día fue dedicado a la prueba del laberinto en T y por último en el cuarto día se sometió a los animales a la prueba del tablero de agujeros. Para poder valorar los diversos parámetros de estas pruebas fue necesario recurrir a una lámpara de luz blanca (75W) como fuente de iluminación.

En el primer día programado para realizar las pruebas, los animales fueron pesados antes de comenzar las pruebas para garantizar así que todos ellos se encontrasen activos de igual manera. En el intervalo de ensayo entre animales se limpiaron bien las superficies de los aparatos con objeto de eliminar el olor del animal anterior, así como la posible orina y las bolas fecales que éste hubiera podido dejar, y de este modo evitar posibles interferencias en el desarrollo de las pruebas con los siguientes animales. Todas las sesiones fueron controladas por tres investigadores y se registraron con ayuda de una videocámara.

Los ratones se marcaron pintando su pelaje con ácido pícrico y giemsa en diferentes localizaciones del pelaje, para llevar a cabo el estudio individualizado. Este procedimiento de marcaje, por su facilidad y permanencia sobre el pelo del animal es adecuado en estudios de media y larga duración, y nos permite trabajar bajo luz roja.

A continuación se describen las pruebas en el orden en que fueron realizadas.

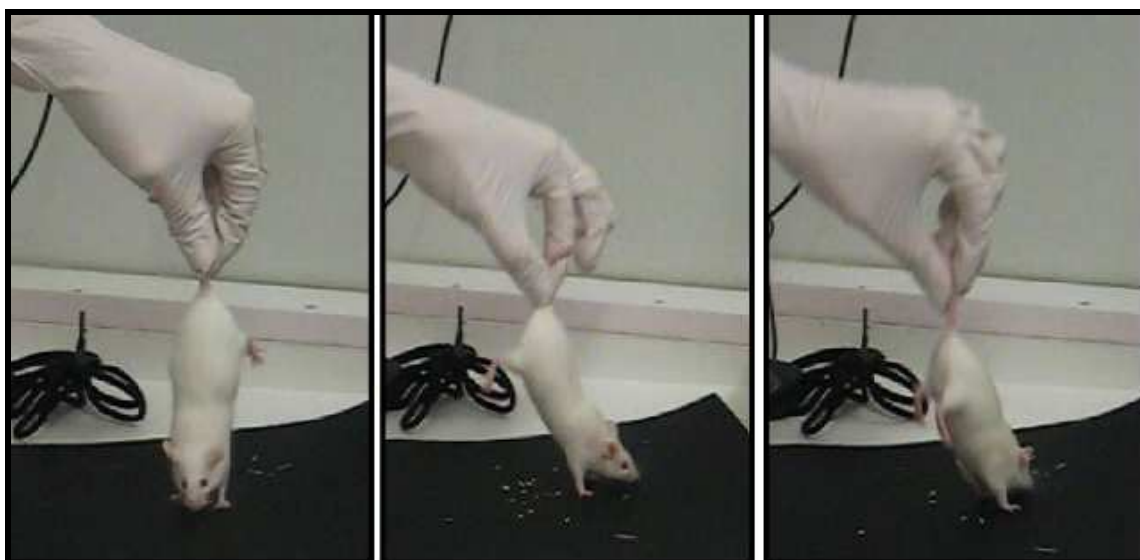
#### **3.6.1.1. Pruebas para valorar la capacidad sensoriomotora.**

La evaluación de esta capacidad se llevó a cabo mediante una amplia batería de pruebas, realizadas en el orden en que se describen: pruebas de reflejo visual, de reflejo de extensión posterior, prueba de la regla de madera y prueba de la cuerda tirante.

**Reflejo visual y reflejo de extensión posterior.** Ambos parámetros se midieron simultáneamente en la misma prueba.

Para evaluar *el reflejo visual* del animal, se sujeta al ratón firmemente por la base de la cola, se suspende en el aire y se le aproxima lentamente a una superficie de apoyo de color oscuro (en este caso, la superficie empleada fue una

cartulina de color negro). En el momento de aproximarse a la superficie, la extensión completa de las patas delanteras se considera una respuesta positiva e indicativa, por tanto, de que el animal conserva intacta su capacidad visual (ver figura 14). El *Reflejo de extensión de las patas posteriores* estudia esta capacidad del animal cuando es suspendido en el aire. Si extiende por completo las patas traseras, esta respuesta se considera positiva y nos indica que el ratón mantiene intacta la capacidad de movimiento del tren trasero (Figura 14). Estas pruebas se realizaron tres veces en cada animal.



**Figura 14. Reflejo visual y reflejo de extensión posterior.**

### **Prueba de la regla de madera**

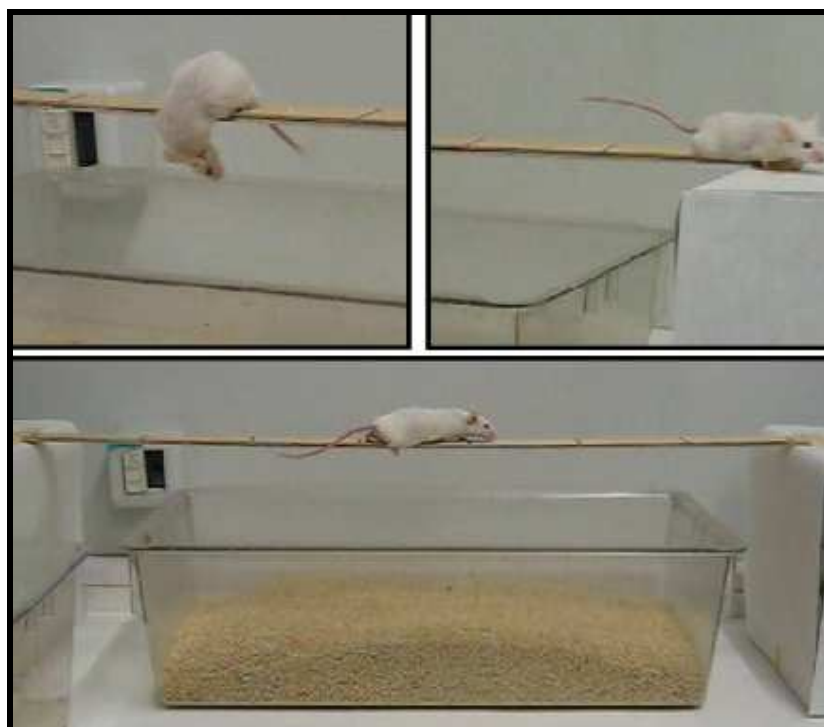
Es una prueba con un nivel de exigencia bajo que permite la valoración de parámetros relacionados con el equilibrio y la coordinación motora.

Consiste en una regla de madera de 80cm de largo y 2,9cm de ancho, dividida en segmentos, aproximadamente de la longitud de los ratones (10cm), apoyada en sus extremos a una altura de 22cm sobre una caja con lecho de viruta.



Para comenzar la prueba, de 20 segundos de duración, los animales fueron colocados en el centro de la regla. Se realizaron dos ensayos consecutivos con cada animal.

En esta prueba se estudió la capacidad de los animales de permanecer en el aparato (en la regla) como medida de equilibrio, analizando el porcentaje de animales de cada grupo que se cayeron durante el tiempo de realización de la prueba (y fueron, por tanto, incapaces de completarla) con respecto al total de animales de grupo. La coordinación motora se estudió de acuerdo con dos criterios definidos: 1) Porcentaje de animales que recorren al menos 1 segmento, y 2) Porcentaje de animales que completan la prueba (dentro de los 20 segundos establecidos como tiempo máximo), ver figura 15.



**Figura 15. Prueba de la regla de madera.**

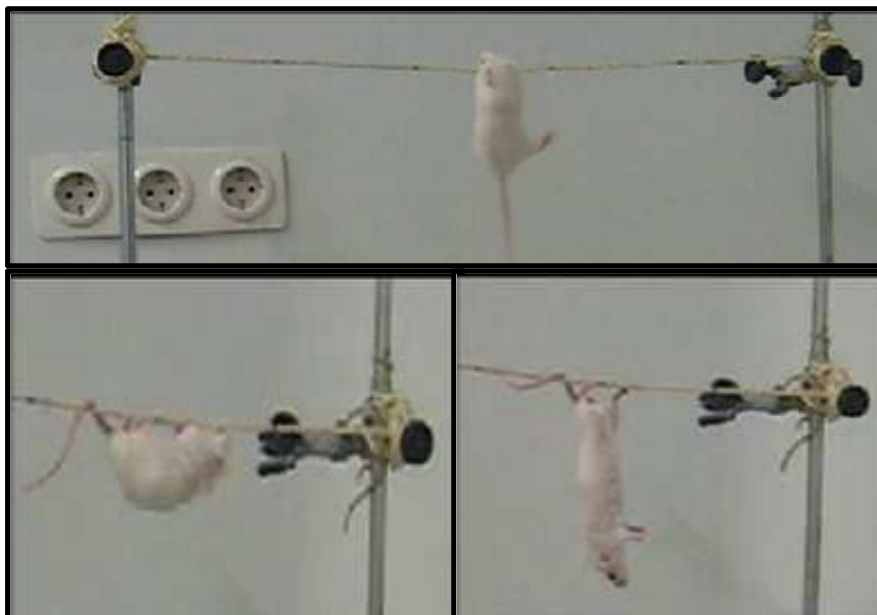
### **Prueba de la cuerda tirante**

Esta prueba se realizó de acuerdo con una técnica previamente desarrollada por Miquel y Blasco (1978) con ligeras modificaciones introducidas por nuestro laboratorio. Sirve para la valoración del vigor neuromuscular, la coordinación motora y la tracción de los animales (entendida esta última como las partes del cuerpo que son capaces de emplear para sostenerse en la cuerda: patas delanteras, traseras y cola). El aparato empleado consiste en una cuerda de cáñamo de 3mm de diámetro de 60 cm de longitud y dividida en segmentos de 10 cm que se sitúa elevada (a una altura de 40 cm) en posición horizontal sobre un lecho de viruta. La cuerda está sujeta en sus extremos a dos barras metálicas verticales que la mantienen tirante (Figura 16).

Para comenzar la prueba los ratones fueron colocados en el centro de la cuerda, colgando, sujetos por sus extremidades delanteras. Se realizaron primero dos ensayos de 5 segundos de duración cada uno, retirando al ratón una vez transcurrido ese tiempo. La prueba se realizó inmediatamente después de los ensayos y tuvo una duración de 60 segundos.

Como parámetros de vigor neuromuscular se estudiaron: el porcentaje de animales que se caen de la cuerda y la latencia de caída (el tiempo que tarda en caer, en segundos). En cuanto a la coordinación motora, se siguieron los criterios siguientes: 1) porcentaje de animales que recorren al menos 1 segmento de la cuerda, y 2) porcentaje de animales que completan la prueba (es decir, que alcanzan uno de los soportes situados en ambos extremos de la cuerda dentro del tiempo establecido). Finalmente, para determinar la tracción de los animales, esto es la capacidad de agarrarse a la cuerda, se contabilizó el porcentaje de animales

de cada grupo que empleaban tres partes de su cuerpo como herramienta para permanecer colgados (patas delanteras, traseras y cola), dos de ellos (patas delanteras y cola, o patas delanteras y traseras) o una sola (patas delanteras).



**Figura 16. Prueba de la cuerda tirante.**

### **3.6.1.2. Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad**

Para evaluar la capacidad exploratoria y la conducta de ansiedad, se llevaron a cabo la prueba de neofobia, la prueba del campo abierto, el laberinto en T y el tablero de agujeros.

#### **Prueba de las esquinas “Neofobia”**

Esta prueba también conocida como “corner test”, fue realizada durante el segundo día y permite evidenciar fundamentalmente el comportamiento de neofobia y exploración que presenta un animal en los primeros segundos, de ser trasladado de su jaula a un entorno nuevo.

Consiste en sacar al animal de su jaula y colocarlo en el centro de una caja nueva con dimensiones: 220 cm de ancho, 220 cm de largo y 145 cm de altura con 200 ml de viruta, durante 30 segundos.

En esta prueba se midió la actividad exploratoria horizontal, expresada como el número de esquinas que visitaron, y la actividad exploratoria vertical, contabilizando el número de levantamientos o “rearings”, asimismo la latencia de aparición del primer “rearing”. Se denomina “rearing” la conducta de los animales que consiste en levantarse sobre sus dos extremidades inferiores y apoyar las superiores en la pared de la caja (“rearing” de pared), o levantarse sin apoyar las extremidades superiores (“rearing” de centro).

### **Campo abierto**

Inmediatamente después de la prueba de neofobia, se realizó la prueba del campo abierto para evaluar la capacidad locomotora de los animales, así como para determinar en los mismos la presencia o ausencia de conductas relacionadas con la ansiedad. La prueba duró 5 minutos durante los cuales se midieron diversos parámetros representativos de las conductas que pretendíamos analizar.

El campo abierto consiste en una superficie cuadrada de madera (dimensiones: 80 cm de ancho, 80 cm de largo y 30 cm de altura), dividida en 64 cuadrículas (10 x 10cm) y rodeada por cuatro paredes (25cm de altura). Los 28 cuadros que componen el perímetro del campo se denominaron “cuadrantes externos”; los cuadros del interior del campo (36) se denominaron “cuadrantes internos”. El tablero se encuentra alzado sobre el suelo de modo que el foco de luz lo ilumine homogéneamente. La duración de la prueba es de 5 minutos y comienza

cuando se coloca al animal en el centro del tablero, de espaldas al investigador (ver figura 17).

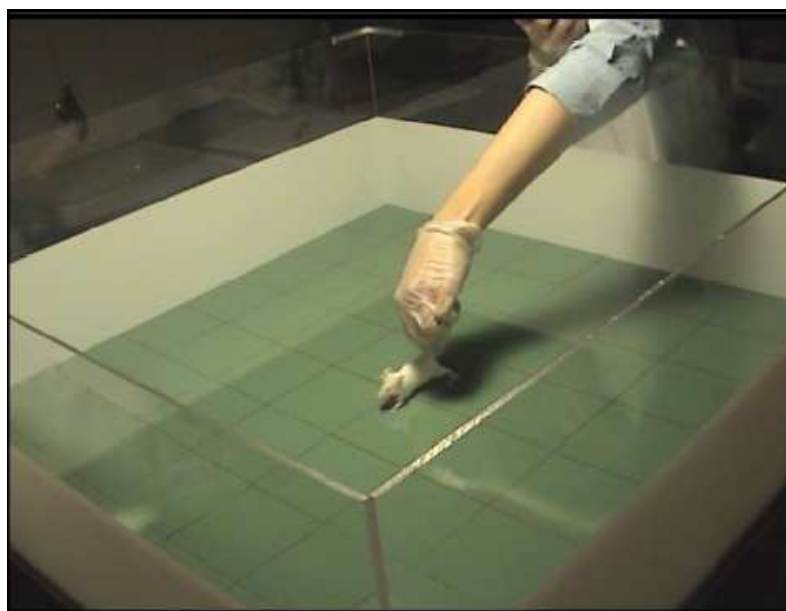
La prueba comenzó una vez el animal era colocado en el punto central del tablero de espaldas al experimentador.

Los parámetros medidos fueron los siguientes:

- Actividad locomotora horizontal:
    - Deambulaci3n externa: medida como el n3mero de cuadrantes externos que recorren. Se consideraron cuadros recorridos aquellos que los animales atravesaban con las cuatro extremidades.
    - Deambulaci3n interna: n3mero de cuadrantes internos recorridos. El criterio para considerar un cuadro recorrido fue el mismo que en la deambulaci3n externa.
- Estos dos parámetros permitieron calcular la deambulaci3n total, como la suma de ambas, y el porcentaje de deambulaci3n interna con respecto a la total.
- Tiempo de salida del centro: se valor3 el tiempo que tardaron los animales en abandonar el punto central donde fueron colocados.
  - Tiempo de entrada en la periferia: se midi3 el tiempo que tardaron en llegar a los cuadrantes externos.

- Actividad locomotora vertical: se analizó el porcentaje de animales que realizaron “rearing” (en pared o central), en algún momento durante la prueba y el número total de “rearings” realizados. También se valoró la latencia o tiempo transcurrido hasta el primer “rearing”. A partir de estos datos, se extrajeron otros como: el porcentaje de animales que realizaron “rearing” en el primer minuto y el porcentaje de animales del total que realizaron “rearing” centrales.

- Conducta de “grooming”, es la conducta de acicalamiento que presentan los ratones y que incluye los “grooming” realizados en patas delanteras, cara y cuerpo del ratón. Se evaluó el porcentaje de animales que presentaron “grooming”, y el número total de estos. También se valoró la latencia o tiempo transcurrido hasta el primer “grooming”.



**Figura 17. Prueba del campo abierto.**

Además se midió la presencia y cantidad de orinas y defecaciones (número de bolas fecales), el porcentaje de animales que defecaron y el porcentaje de animales que orinaron.

### **Tablero de agujeros**

Esta prueba permite evaluar la actividad exploratoria dirigida de los animales gracias a la presencia de agujeros en el tablero que atraen la atención del ratón hacia el centro del campo. El tablero de agujeros utilizado estaba diseñado específicamente para ratón (dimensiones: 60 cm de ancho, 60 cm de largo y 45 cm de alto), con una pared oscura de metacrilato y una base con cuatro agujeros de idéntico tamaño (3,8 cm de diámetro). La base del tablero está dividida en 36 cuadrantes de 10 x 10 cm. De ellos, los 20 que componen el perímetro se consideran “cuadrantes externos”, y 16 son los “cuadrantes internos”.

Los orificios, se encuentran situados cada uno en las esquinas de la intersección formada por los cuatro cuadros centrales y los 12 que los rodean. Para estimular la actividad dirigida del ratón, se colocaron objetos de plástico, del mismo color, dentro de cada uno de ellos.

Al comenzar la prueba los ratones fueron colocados, de espaldas al investigador, en una esquina del campo, al estar los objetos que constituían el refuerzo positivo en el centro. La prueba tuvo una duración de 5 minutos (ver figura 18). La actividad exploratoria medida se puede desglosar de la siguiente manera:

Actividad exploratoria no dirigida: se trata de parámetros que evalúan la exploración del ratón más allá de la presencia de los agujeros del tablero e incluye aquellos ya medidos en el campo abierto:

- Actividad locomotora horizontal:
  - Deambulaci3n externa: considerada como el n3mero de cuadrantes externos que recorren.
  - Deambulaci3n interna: medido como el n3mero de cuadrantes internos recorridos y que incluyen aquellos que presentan los agujeros.

Se obtuvo tambi3n la deambulaci3n total como suma de las anteriores.

- Tiempo de salida al centro: tiempo que tardan en abandonar la esquina donde han sido colocados.

- Actividad locomotora vertical: se contabiliz3 el porcentaje de animales que presentaron “rearing” y su n3mero total (incluyendo “rearing” de pared y “rearing” central), adem3s de la latencia hasta la realizaci3n del primer “rearing”. Tambi3n se obtuvo el porcentaje de animales que realizaron “rearing” central.

Actividad exploratoria dirigida, centrada en la interacci3n de los animales con los agujeros, midiendo:

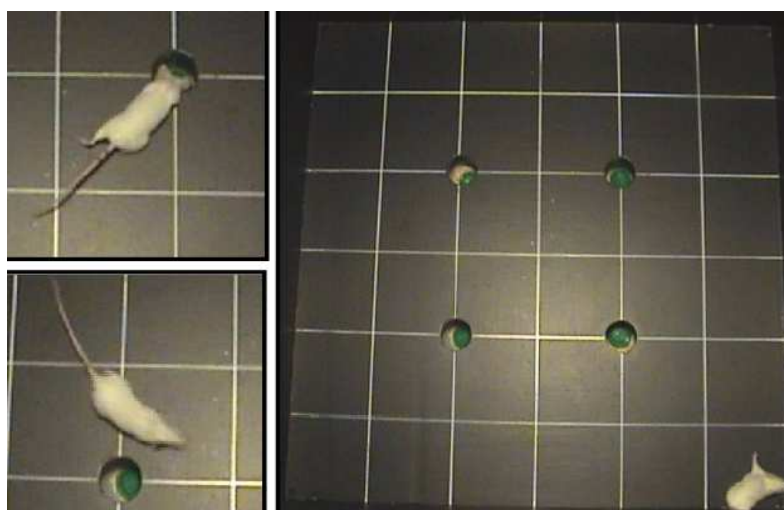
- N3mero total de exploraciones en agujeros y tiempo total de exploraci3n en ellos: donde se consideraron como exploraciones las ocasiones en que los ratones introduc3an la cabeza dentro de los orificios, denominado tambi3n “head-dipping”.



- Latencia hasta el primer agujero: se midió el tiempo transcurrido hasta que realizaron la primera exploración en un agujero.

La conducta de “grooming se valoró midiendo, como al igual que se midió en el campo abierto, el porcentaje de animales que la presentaron, el número de “grooming” realizados, y el tiempo transcurrido hasta el primer “grooming.

La presencia y cantidad de orinas y defecaciones, como número de bolas fecales, así como el porcentaje de animales que defecaron y el porcentaje de animales que orinaron, también fueron medidos



**Figura 18. Prueba del tablero de agujeros.**

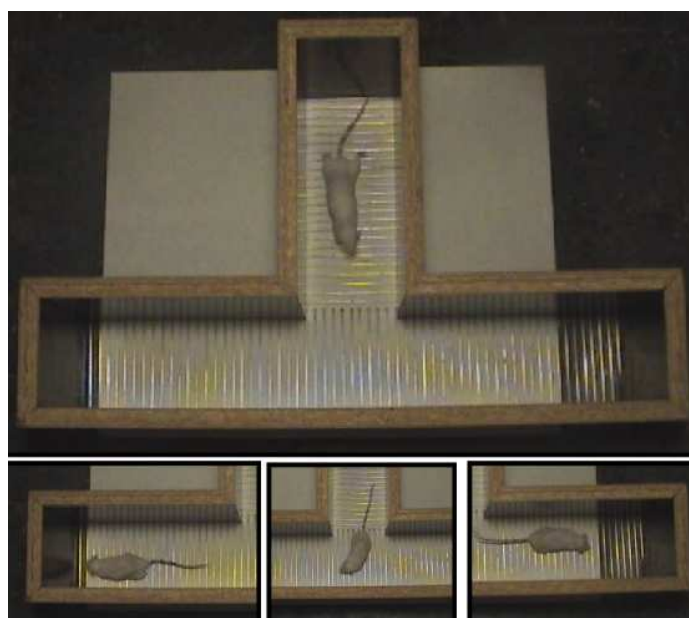
### **Laberinto en T**

El tercer día se realizó la prueba del laberinto en T, para evaluar la capacidad exploratoria de los ratones.

Este laberinto en T está construido en madera, con las paredes recubiertas de una lámina plástica de color negro. Los brazos miden 10 cm de ancho por 25 cm

de largo y 19 cm de alto; el suelo del laberinto está formado por varillas cilíndricas de aluminio de 3mm de diámetro, separadas por 5mm unas de otras, y situadas transversalmente a las paredes laterales del brazo.

Los ratones fueron depositados en el extremo del brazo corto, de frente a la pared. No se utilizó ningún refuerzo positivo o negativo para dirigir la exploración de los animales (ver figura 19). Los parámetros de actividad horizontal que se midieron fueron: el tiempo que tardaron en atravesar con las cuatro patas la intersección formada por el brazo corto y el largo del laberinto y el tiempo empleado por el ratón en recorrer los tres brazos del laberinto (“eficacia exploratoria”). La actividad exploratoria vertical o conducta de “rearing” también fue recogida, así como la conducta de “grooming” y la presencia de orina y defecaciones, de modo similar a lo indicado en la prueba del campo abierto.



**Figura 19. Prueba del laberinto en T.**

### **3.6.2. Modelo de envejecimiento prematuro**

Para clasificar a los ratones como prematuramente envejecidos (PAM: “prematurely-aging mice”) o no prematuramente envejecidos (NPAM: “non prematurely-aging mice”), se realizó *la prueba comportamental del laberinto T*. Tras una semana de aclimatación en el animalario, se sometió a los animales a la prueba de del laberinto en forma de T, siguiendo una metodología previamente descrita (Guayerbas *et al.*, 2002). Se contabilizó el tiempo empleado por cada ratón en recorrer el brazo central de la T, sin suministro de cualquier refuerzo positivo o negativo. La prueba se realiza colocando al ratón en el extremo del brazo central, mirando hacia la pared y se contabilizan los segundos que tarda el animal en atravesar con las patas traseras la intersección con los brazos laterales de laberinto (Ver figura. 20). La duración máxima de las prueba es de 60 seg. Esta prueba siempre se realizó a la misma hora del día (entre 8:00 am y 10:00 h bajo luz roja), en cuatro semanas consecutivas realizando una sesión por semana.



**Figura 20. Prueba de envejecimiento prematuro a través del laberinto en T.**

A los ratones que realizaron la prueba en menos de 10 seg durante cuatro semanas consecutivas se les considero NPAM (de las siglas en inglés “non prematurely-aging mice”), y los animales que en las cuatro ocasiones tardaron más de

ese tiempo o no superaron la prueba (mayor de 60 seg), se les denominó PAM (de las siglas en inglés “prematurely –aging mice”) (Guayerbas et al., 2002; Guayerbas y De La Fuente, 2003). Por otro lado, aquellos animales que no cumplieron las condiciones antes mencionadas, fueron excluidos del estudio.

### **3.6.3. Obtención de la suspensión peritoneal. Recuento y viabilidad celular**

Todos los ensayos realizados se llevaron a cabo en leucocitos procedentes del peritoneo, de las cepas ICR/CD1 y C57BL/129. La suspensión peritoneal fue obtenida en cada animal sin necesidad del sacrificio ni anestesia del mismo, siguiendo el protocolo previamente descrito (Guayerbas *et al.*, 2002; De la Fuente *et al.*, 2004).

Los leucocitos del peritoneo fueron obtenidos a las 0 (es la toma basal previa a la inyección de la endotoxina), 2 y 24 horas corresponden a las extracciones tras inducir el shock endotoxico, siempre a la misma hora y en la fase oscura de su ciclo vital (8.00-9.00 h). Este procedimiento de extracción de leucocitos peritoneales, fue realizado en todos los grupos experimentales utilizados para este estudio, mediante el siguiente protocolo:

**1) Sujeción del animal:** con los dedos pulgar e índice se sujetó al ratón por la piel de la parte posterior de la cabeza; se le dio la vuelta, colocándolo boca arriba y se inmovilizaron las extremidades inferiores sujetando la cola por su zona más anterior entre los dedos anular y meñique, y la palma de la mano.

**2) Inyección de un medio salino:** una vez inmovilizado el ratón, se le inyectó intraperitonealmente un volumen de 3 ml de solución de Hank estéril y atemperada a 37 °C, y se masajeó suavemente el abdomen.

**3) Obtención de la suspensión peritoneal:** La suspensión peritoneal va saliendo por el mismo orificio por el que fue introducida la solución de Hank's, recogién dose aproximadamente el 90% del volumen inyectado, el cual se depositó en un tubo de vidrio estéril y se mantuvo en hielo.

**4) Recuento de las células de la suspensión peritoneal:** Las células obtenidas del peritoneo fueron principalmente linfocitos y macrófagos, en proporción aproximada del 60% y 40%, respectivamente. Los macrófagos y linfocitos fueron identificados por su morfología y tamaño característicos, y contabilizados por ml de suspensión utilizando un hemocitómetro de Neubauer y un microscopio óptico de contraste de fase.

**5) Viabilidad celular:** La viabilidad de las células extraídas y utilizadas en los distintos ensayos fue comprobada mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán. Este colorante, en solución al 0,4%, se añadió 1:1 (v/v) a la suspensión celular e inmediatamente se contabilizaron en hemocitómetro de Neubauer las células que aparecían teñidas de azul (muertas) y las que no se encontraban teñidas (vivas). El test de viabilidad del azul tripán se hizo de forma rutinaria antes y después de la realización de cada ensayo. En todos los experimentos que se llevaron a cabo, solamente se utilizaron las suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 98%.

### **3.6.4. Valoración de los parámetros de función inmunitaria**

#### **3.6.4.1. Estudio de la funcionalidad de los macrófagos**

Los macrófagos obtenidos en la suspensión peritoneal se ajustaron a  $5 \times 10^5$  macrófagos/ml en solución de Hank's, con la excepción de la valoración la capacidad microbici da, para la cual se ajustaron a  $1 \times 10^6$  leucocitos totales/ml. Se

valoraron distintas etapas del proceso fagocítico: la capacidad de migración dirigida hacia un foco inflamatorio (también conocida como “capacidad quimiotáctica”), la capacidad de ingestión del material extraño (o “capacidad fagocítica”), y la actividad de digestión del material fagocitado mediante la producción de anión superóxido intracelular.

### **Movilidad espontánea e inducida o quimiotaxis**

La movilidad inducida o quimiotaxis de las células fagocíticas se evaluó siguiendo la técnica descrita por Boyden (1962), ligeramente modificada por De la Fuente et al. (1997, 2000), basada en que estas células poseen la capacidad de desplazarse hacia un gradiente químico generado desde el foco infeccioso, el cual puede reproducirse experimentalmente empleando péptido formulado (f-Met-Leu-Phe ) procedente de la pared bacteriana de *E.coli* (Snyderman y Pike, 1984; Schubert y Muller, 1989).

El método consiste en la utilización de cámaras con dos compartimentos (de 9 mm de diámetro interno y 13 mm de diámetro externo) separados por un filtro de nitrocelulosa de 3µm de poro. Una vez ajustada la suspensión peritoneal a  $5 \times 10^5$  macrófagos/ml, se depositaron 300µl en el compartimento superior de la cámara. En el compartimento inferior se depositaron alícuotas de 400µl del agente quimioatrayente péptido formulado (fMLP) a una concentración de  $10^{-8}M$ . Para valorar la movilidad espontánea en el compartimiento inferior de la cámara de Boyden se depositaron 400µl solución Hank's.

Una vez cargadas, las cámaras se incubaron durante 3 horas en una estufa a una temperatura de 37° C, con un aporte de 5% de CO<sub>2</sub> y con humedad a

saturación. Pasado ese tiempo, se recuperaron los filtros, que fueron fijados y teñidos según los siguientes pasos:

1. Metanol al 50% (4 minutos).
2. Etanol al 75% (4 minutos).
3. Agua Destilada (2 minutos).
4. Eosina-Azul de Metileno (45 minutos).
5. Agua destilada (2 minutos).

Tras el último paso de lavado con agua destilada, los filtros se colocaron sobre un portaobjetos con la cara inferior hacia arriba. A continuación se les colocó un cubreobjetos por encima, y se llevó a cabo el recuento del número de macrófagos presentes en el filtro. Para el recuento se empleó un microscopio óptico (objetivo 100x), realizando en cada filtro 4 barridos de 5 mm cada uno (de modo que se recorre aproximadamente la tercera parte del filtro). El valor obtenido en el recuento representa el “*Índice de Quimiotaxis*” (I.Q). En el caso de movilidad espontánea se representa “*Índice de Movilidad Espontánea*” (I.M.E). En todos los experimentos se realizaron los ensayos por duplicado.

### **Capacidad fagocítica**

Se analizó la capacidad de los macrófagos para ingerir partículas inertes, en este caso, bolas de látex, siguiendo la técnica descrita por De la Fuente (1985). Se dispensaron en placas M.I.F (placas *Kartell* de 8 pocillos con un diámetro de 1,5 cm de diámetro) alícuotas de 200  $\mu$ l de la suspensión peritoneal ajustada a  $5 \times 10^5$  macrófagos/ml en solución de Hank's, se incubaron a 37°C durante un intervalo 30

min, consiguiendo así que las células se adhirieran a la superficie plástica, formando una monocapa al fondo del pocillo, que se lavó posteriormente con PBS atemperado a 37°C para eliminar las células no adheridas. Seguidamente, se añadieron 200 µl de solución de Hank's y 20 µl de látex (1,091 µm de diámetro) al 1% en PBS, y se incubaron de nuevo a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se lavó exhaustivamente con PBS a 37°C para arrastrar el látex no fagocitado. Las células se fijaron con metanol al 50% (5 min) y se tiñeron con eosina-azul de metileno (30 min). Finalmente, se lavó con abundante agua ultrapura para eliminar el exceso de colorante. Una vez secas las placas, se procedió al recuento en el microscopio óptico, con objetivo de 100 aumentos, del número de partículas ingeridas por 100 fagocitos tomados al azar, obteniendo así el "*Índice de Fagocitosis*" (IF). Además, se determinó el porcentaje de células, en las 100 contabilizadas, que fagocitaron al menos una partícula, lo que se denomina "*Eficacia Fagocítica*" (EF).

#### **Capacidad de digestión del material fagocitado. Niveles de anión superóxido intracelulares y extracelulares**

El test de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) nos proporciona una medida de los niveles de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) durante la activación de las células fagocíticas, en una reacción catalizada por una NADPH oxidasa y utilizando NADPH y  $O_2$  como sustratos (Babior, 2002). Se mide gracias a la gran capacidad del anión de reducir compuestos como el NBT que es convertido, en proporción equimolar, en un formazán detectable por espectrofotometría (Basgara *et al.*, 1988).

La técnica se realizó siguiendo una modificación llevada a cabo por Guayerbas y De la Fuente 2003 de la técnica original (De la Fuente, 1985). En tubos



de cristal se dispensan las alicuotas de 250  $\mu$ l de la suspensión peritoneal ajustada a  $1 \times 10^6$  leucocitos/ml y se añaden 250  $\mu$ l de NBT (1mg/ml Hank's). Seguidamente se incorporaron 50  $\mu$ l de la suspensión de látex (1,09 $\mu$ m de diámetro y al 1% en PBS), para estudiar la reducción del NBT en presencia de estímulo fagocítico, y 50  $\mu$ l de Hank's para estudiar la reducción basal de anión superóxido. Transcurrida 1 hora de incubación, en baño de María en agitación suave a 37°C, la reacción se paró introduciendo en los tubos 2,5 ml de ácido clorhídrico (HCL) al 0,5 N, centrifugándose posteriormente durante 30 min a 1600 g y a 4°C. A continuación, se recogieron los sobrenadantes para medir en ellas al anión superóxido extracelular. En el pellet resultante de la centrifugación se extrajo el NBT reducido utilizando 1 ml de dioxano para romper las células, se centrifugaron de nuevo los tubos en las condiciones anteriores y se determinaron las absorbancias de los sobrenadantes a 525nm, con lo que se obtuvo la medida de los niveles de anión superóxido intracelular (parámetro indicativo de la capacidad digestiva del material fagocitado). Los resultados se expresaron en nmoles/ $10^6$  células, tras extrapolar las absorbancias en una curva patrón, obtenida utilizando el ditioeritritol como agente reductor.

#### **3.6.4.2. Estudio de la funcionalidad de los linfocitos**

Los linfocitos procedentes de la suspensión peritoneal, se ajustaron a  $5 \times 10^5$  linfocitos/ml en solución de Hank's para la valoración de la capacidad de quimiotaxis y  $1 \times 10^6$  linfocitos/ml para analizar su respuesta proliferativa.

##### **Capacidad de quimiotaxis**

Los linfocitos al igual que los macrófagos, poseen la capacidad de desplazarse hacia el gradiente químico formado por el péptido formulado

(Schubert y Muller, 1989). Los ensayos se realizaron de la misma forma ya descrita para los macrófagos en el apartado (3.6.4.1).

### **Capacidad proliferativa de los linfocitos**

La actividad más característica de los linfocitos es su capacidad de respuesta proliferativa a antígenos o mitógenos. Para estudiarla se empleó el test de transformación linfoblástica (TTL) en respuesta a mitógenos, siguiendo una metodología estandarizada (Del Río *et al.*, 1994; Carrasco *et al.*, 1997; De la Fuente y Víctor, 2000; Guayerbas *et al.*, 2002; De la Fuente *et al.*, 2004; Alvarado *et al.*, 2006). Este ensayo analiza *in vitro* la repuesta proliferativa frente a mitógenos que reproduce la que tiene lugar *in vivo* frente a antígenos. Su fundamento reside en la capacidad de los linfocitos maduros de transformarse, en condiciones adecuadas, en células con capacidad de división o linfoblastos. Éstos sintetizan ADN, por lo que añadiendo un precursor de la síntesis marcado, como timidina marcada con tritio, puede cuantificarse el crecimiento.

La suspensión peritoneal se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. Se decanto el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio completo (RPMI estéril enriquecido con 10% de suero fetal bovino, descomplementarizado a 56°C durante 1 hora, y suplementado con el antibiótico gentamicina, 10mg/ml, al 1%). Se realizó el recuento celular en la cámara Neubauer y se ajusto a  $1 \times 10^6$  linfocitos/ml de medio completo. Una vez ajustada la suspensión linfoide, se añadió en placas de 96 pocillos con fondo plano, en cada pocillo se colocaron 200  $\mu$ l de muestra y 20  $\mu$ l de los mitógenos Con A (1  $\mu$ g/ml en el pocillos) (proliferación en respuesta al mitógeno), o 20  $\mu$ l de medio completo en los pocillos controles (proliferación espontánea). A continuación se mantuvo la placa en incubación

durante 48 horas, a una temperatura de 37<sup>o</sup> C, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad de saturación. Pasado ese tiempo, se recogieron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo y se añadieron 5 µl de timidina tritiada (0,5 µCi/pocillo) y 100 µl de medio de cultivo completo fresco. En todo momento se trabajó en condiciones de esterilidad. Tras un tiempo mínimo de 8 horas de incubación, se recolectaron las células en un recolector semiautomático, de modo que éstas se fragmentaron y el ADN marcado de sus núcleos quedó impregnado en los filtros. Éstos se incluyeron a continuación en unos viales que contenían 5ml de líquido de centelleo, y se valoró su radiactividad en cuentas por minuto (cpm) con la ayuda de un contador β de centelleo. En todos los experimentos se realizaron los ensayos por triplicado, utilizándose el valor promedio de cada triplicado para la obtención de los datos. Los resultados se expresan como % de estimulación (calculando el valor de 100 a las cpm de los pocillos en los que se ha valorado la proliferación espontánea).

#### **3.6.4.3. Actividad citotóxica “natural killer” NK**

Este ensayo consistió en la valoración de la capacidad citotóxica, concretamente la llamada citotoxicidad natural o NK de los leucocitos peritoneales frente a células tumorales.

Célula diana: Se utilizaron como diana la línea celular YAC-1 de linfoma murino. Estas células se mantienen almacenadas a -80<sup>o</sup>C en crioviales estériles con medio completo y el agente dimetil sulfoxido (DMSO), que preserva la integridad de las membranas celulares. Un par de semanas antes de realizar el ensayo se descongela un vial de células YAC-1 y se transfiere todo el volumen de células tumorales a un tubo de plástico estéril. A continuación se realiza un lavado (1500 rpm, 5 minutos) para eliminar el DMSO. Tras la centrifugación se elimina el

sobrenadante, se añade más medio completo y se lleva a cabo un segundo lavado (1500 rpm, 10 minutos). De nuevo se decanta el sobrenadante, y el “pellet” de células tumorales se resuspende en medio completo fresco. Finalmente, se transfiere todo el volumen a un falcón estéril y se mantiene en condiciones de esterilidad en un incubador (a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>) para permitir el crecimiento de las células tumorales y obtener de este modo un número de células suficiente en el momento en que se vaya a comenzar el ensayo. Mientras tanto, cada 2 días se comprueba la viabilidad de dichas células tumorales (mediante el recuento de viabilidad celular descrito en el apartado 3.6.3) y se renueva periódicamente el medio completo para permitir el crecimiento celular. Al cabo de pocos días, cuando las células comienzan a mostrar un crecimiento exponencial, se transfieren alícuotas de 2-3 millones a otros flask en los que se añade medio completo fresco. Así nos aseguramos que de las células tienen nutrientes suficientes para seguir creciendo y se mantiene intacta su viabilidad. En el momento de llevar a cabo el ensayo de actividad NK, se transfiere todo el volumen del flask (donde han crecido las células) de nuevo a un tubo estéril, se realiza un lavado (1500 rpm, 10 minutos) y se decanta el sobrenadante. El pellet se resuspende en 1 ml de RPMI sin rojo fenol (un medio que no tiene color, para evitar la interferencia del mismo en la valoración espectrofotométrica). A continuación se lleva a cabo el recuento celular y se ajustan 100.000 células vivas/ml de medio RPMI sin rojo fenol. La viabilidad de las células se analizó mediante la prueba del azul tripán (apartado 3.6.3). Finalmente, una vez realizados los ensayos, las células YAC-1 que no se han utilizado se vuelven a congelar en crioviales estériles. En ellos se añade un volumen de aproximadamente 500µl que contenga 2-3 millones de células YAC-1, se completa hasta un volumen de 900µl con medio completo, y por último se

añaden 100 µl de DMSO. Estos crioviales se mantienen congelados a -80° C hasta el momento de volver a realizar el siguiente ensayo.

Ensayo de citotoxicidad: El ensayo se realizó mediante un kit de ELISA comercial (Cytotox 96. PROMEGA) siguiendo la metodología previamente descrita por Ferrández et al 1999, cuyo fundamento consiste en valorar la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) liberada al sobrenadante por parte de las células lisadas. Las células efectoras (leucocitos peritoneales) se ajustaron a 10<sup>6</sup> células/ml para obtener así una relación de 10:1 (10 células efectoras: 1 célula diana). A continuación, se dispensaron 100µl de la suspensión de células efectoras en placas de 96 pocillos con fondo en “U”, a los que se añadieron 100µl de la suspensión de células diana. Además se incluyeron pocillos en los que únicamente se adicionaron células diana, con objeto de cuantificar la lisis espontánea y total de las mismas. Del mismo modo, se incluyeron otros pocillos que contenían únicamente células efectoras, para obtener así su posible lisis espontánea. Estos pocillos se completaron con 100µl de medio RPMI sin rojo fenol. A continuación se centrifugó la placa a 1250 rpm durante 5 minutos para favorecer los contactos celulares y se incubó durante 3 horas y 15 minutos a 37° C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se añadieron 20µl de solución de lisis (HCl) o detergente Tritón X-100 a los pocillos destinados a cuantificar la lisis total de las células diana. Tras 45 minutos, se volvió a centrifugar la placa en las mismas condiciones que antes, se recogieron 50µl de los sobrenadantes de todos los pocillos y se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo plano. A continuación, a cada pocillo se añadieron 50µl de una mezcla de sustratos de la enzima Lactato Deshidrogenasa (lactato, diaforasa y NAD<sup>+</sup>) y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado ese tiempo, se paró la

reacción añadiendo a los pocillos 50µl de una solución de parada y se midió la absorbancia a 490nm. Finalmente, se calcula el porcentaje de lisis con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lisis} = \frac{(\text{Lisis}_{\text{problema}} - \text{Lisis}_{\text{espontánea céls. efectoras}} - \text{Lisis}_{\text{espontánea céls diana}})}{(\text{Lisis}_{\text{total}} - \text{Lisis}_{\text{espontánea céls. diana}})} \times 100$$

Siendo:

- Lisis problema: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos donde se incuban células efectoras junto con células diana.
- Lisis espontánea: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos sembrados sólo con células diana o con células efectoras.
- Lisis total: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos que contenían células diana, a los que se añadieron 20 µl de solución de lisis (HCl) o detergente Tritón X-100.

En todos los experimentos se realizaron los ensayos por triplicado, utilizándose en la ecuación el valor medio de las absorbancias obtenidas para cada tipo de lisis.

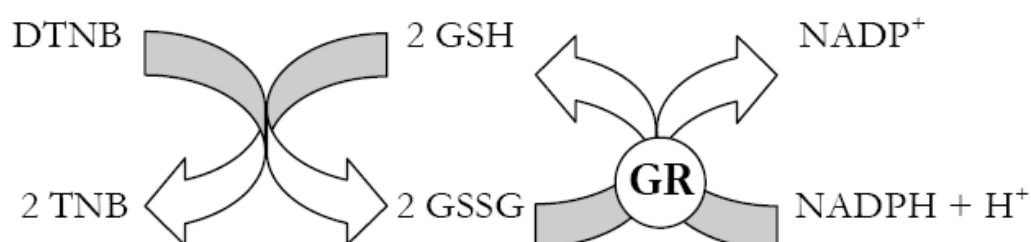
### **3.6.5. Valoración de los parámetros de estrés oxidativo**

#### **3.6.5.1 Valoración de defensas antioxidantes**

De las diferentes defensas antioxidantes presentes en los leucocitos, que les permiten neutralizar los radicales de oxígeno que producen, se valoró los niveles de glutatión total y la actividad de la enzima catalasa (CAT).

## **Niveles de glutatión**

El glutatión es el antioxidante más potente presente en el organismo, gracias a la acción reductora del grupo tiol de su cisteína. La valoración del glutatión, tanto en su estado reducido (GSH) como en el oxidado (GSSG), es considerada un estimador muy fiable del grado de estrés oxidativo (Viña, 1990). Se determinó experimentalmente el glutatión total, formado mayoritariamente por su forma reducida. La valoración del glutatión está fundamentada en el reciclado enzimático a través del que el glutatión es secuencialmente oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH, en presencia de la enzima glutatión reductasa (GR) (Tiezte,1969):



Para la determinación del contenido en glutatión total intracelular de los leucocitos peritoneales murinos, se siguió el método previamente descrito (Alvarado *et al.*, 2006a; 2006b). Las muestras fueron ajustadas a  $1 \times 10^6$  células/ml en solución de Hank's. Las células fueron entonces centrifugadas en frío (2500rpm, 10 min, 4°C) y se desechó el sobrenadante y el sedimento de leucocitos se resuspendió en 100 µl de ácido tricloracético (TCA) al 5% con HCl 0,01 N en frío (La solución de TCA se desoxigenó previamente burbujeándola con helio durante 10 min), que evita la autooxidación del GSH, sensible a pH y temperatura. Se sonicaron las células, también en frío, realizándose 3 ciclos de sonicación de 10 s

cada uno al 70 % de la potencia máxima (70 W), y se dejaron 20 s de reposo entre ellos. A continuación, se añadieron 400 µl de solución de TCA, se centrifugaron las muestras a 3200g durante 5 minutos a 4°C en frío. Las valoraciones se llevaron a cabo mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 412 nm y en cubetas de vidrio óptico, analizando la cinética de la reacción durante un periodo de tiempo de 260 segundos. También se realizaron medidas de la reacción sin muestra (sustituyendo ésta por TCA) para no sobrevalorar el contenido de glutatión. Además, se realizó una curva patrón a partir de una solución madre que contenía 16 mg de glutatión en 250ml de TCA 5% HCl 0,01N, de la que se hicieron sucesivas diluciones en tampón fosfato con EDTA 6,3 mM. Los valores finales son expresados en nmoles/10<sup>6</sup> células.

Para la medida de la absorbancia se usaron microcubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso de luz conteniendo:

- 1) Reacción con muestra: 500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl muestra y 70 µl GR.
- 2) Reacción sin muestra: 500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl solución de TCA y 70 µl GR.
- 3) Blanco: 500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl muestra y 70 µl solución de TCA.

$$\text{nmol GSH}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003] \times (10^6/X)$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$ :  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  reacción con muestra -  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  reacción sin muestra.

$(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003$ : nmol GSH en cubeta.

X: el número de células equivalente a los 70 µl de muestra valorados (1,4x10<sup>5</sup> células).



### **Actividad de catalasa (CAT)**

La determinación de la actividad enzimática de la catalasa se llevó a cabo según la técnica descrita por Beers y Sizer (1952) con modificaciones hechas en nuestro laboratorio. Este método se basa en la reacción de descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que lleva a cabo esta enzima, por lo que se valora la desaparición de dicho sustrato con el descenso de la absorbancia a 240 nm por unidad de tiempo.



Para el análisis de la actividad de la CAT se resuspendieron los leucocitos peritoneales ajustados  $1 \times 10^6$  leucocitos/ml en 100  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 50mM pH 7.0, se sonicaron en frío (3 ciclos de 10 segundos cada uno, separados por 20 segundos de descanso entre cada ciclo) y se centrifugaron a 3200g durante 20 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación, se recogieron los sobrenadantes y se llevaron a cabo las medidas espectrofotométricas a 240 nm, en cubetas de cuarzo y a temperatura ambiente. Cada ensayo duró 60 segundos (realizándose medidas cada 10 segundos), obteniéndose como dato de Abs el incremento final.

Los resultados se obtuvieron con ayuda de la siguiente expresión:

$$\text{U Cat}/10^6 \text{ células} = \frac{\text{Abs/min} \times F \times 1 \times 10^6}{\epsilon \times X}$$

Donde 1 U =  $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  consumido/min

siendo,

- Abs/min: incremento final de absorbancia, medido a 240 nm.
- F: factor de dilución ( $V_{\text{total en cubeta}}/V_{\text{muestra}} = 0,7\text{ml}/0,030\text{ml}$ ).
- $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240nm ( $43,6 \times 10^{-3}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).
- X: nº de células presentes en los 30µl de muestra que se utilizan en la valoración.

### **3.6.5.2 Valoración de agentes oxidantes**

#### **Niveles de anión superóxido extracelular**

Se siguió la técnica previamente descrita en el apartado 3.6.4.1, referente a la valoración de los niveles de anión superóxido intracelular. Los sobrenadantes recogidos tras la incubación de una hora en baño de María y la centrifugación siguiente, fueron los utilizados para cuantificar el anión superóxido extracelular, que fue medido por espectrofotometría a 525 nm. Los resultados se expresaron en nmoles/ $10^6$ células.

#### **Actividad xantina oxidasa**

Para valorar la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO), la cual es un productor de ROS, se emplearon alícuotas de 50 µl de la suspensión peritoneal ajustada a  $10^6$  leucocitos/ml de medio Hank, que fueron lisadas mediante congelación descongelación a  $-20^\circ\text{C}$ . El análisis de la actividad enzimática se llevó a cabo mediante un ensayo fluorométrico utilizando el kit comercial “Amplex Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay Kit” (Molecular Probes). Este kit se basa en la capacidad de la enzima XO de producir el radical libre anión superóxido como consecuencia de su actividad normal en la ruta de catabolismo de las purinas (xantina), dando lugar a ácido úrico. Cuando se añade la mezcla de reacción, el anión superóxido producido por la XO se degrada espontáneamente, dando lugar a

la aparición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Éste a su vez, en presencia de peroxidasa de rábano, reacciona estequiométricamente con el reactivo Amplex Red y genera así un compuesto de oxidación fluorescente rojo, la resorufina. La resorufina presenta una fluorescencia de emisión máxima a 585 nm y alto coeficiente de extinción ( $54000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). Después de 30 min de incubación en oscuridad, se midió la fluorescencia en un lector de placas en una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 595 nm. Se realizaron curvas patrón con xantina a diferentes concentraciones. A partir de dichas rectas se obtuvieron las expresiones de los niveles de actividad de la enzima. Los resultados se expresaron en miliunidades internacionales (mU) de actividad enzimática de  $10^6$  leucocitos/mg de proteína.

Valoración de proteínas: El contenido en proteína de esas muestras fue evaluado mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (similar al de Lowry), que se basa en la formación de complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína en condiciones alcalinas, a lo que sigue la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . La cantidad de reducción es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. El BCA forma un complejo púrpura-azul con el  $\text{Cu}^{1+}$  en ambientes alcalinos, proporcionando una base para monitorizar la reducción por parte de las proteínas del  $\text{Cu}^{2+}$  alcalino. Después de 30 min de incubación, se mide la absorbancia a 560 nm.

### **3.6.6. Estudio de la expresión en membrana de marcadores celulares**

Para analizar en muestras de suspensión peritoneal, la presencia de los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b y CD45RA, que permiten identificar diferentes subpoblaciones leucocitarias, se llevó a cabo una citometría de flujo utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales:

- CD3 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Pharmingen).
- CD4 conjugado con PE-cianina (PE-Cy5, BD Pharmingen).
- CD8 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Pharmingen).
- CD11b: conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, catalogo Laboratories).
- CD19 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Pharmingen).
- CD45RA conjugado con ficoertirina (PE).

Tras obtener la suspensión peritoneal, ésta se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de medio PBS BSA (1%). Tras el recuento celular, se procedió a preparar alícuotas ajustadas a 200.000 células/ml, que son las que fueron empleadas para el marcaje. Una vez preparadas, se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se añadió un volumen de 30µl con la mezcla de anticuerpos correspondiente (CD3/CD8, CD19/CD45RA y CD11b/CD45RA). Asimismo, se prepararon tubos con marcajes simples para ajustar las condiciones del citómetro antes de empezar a adquirir las muestras. Las alícuotas con las mezclas de anticuerpos se incubaron durante 30 minutos en frío y en oscuridad y, pasado ese tiempo, se realizaron dos lavados (añadiendo PBS-BSA y centrifugando a 1800 rpm durante 5 minutos y a 4°C) para retirar el exceso de anticuerpo no unido, e inmediatamente las muestras se pasaron por el citómetro de flujo (FACSCalibur Flow Cytometer). El análisis de resultados se realizó con ayuda del software Cell Quest Pro (BD Biosciences). Los resultados obtenidos se enuncian como % de células que expresan, respecto al total de células, cada uno de los marcadores utilizados.

### **3.6.7 Análisis Estadístico:**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la presente tesis fue llevado a cabo con el paquete estadístico SPSS 15.0. Los resultados se expresaron como media aritmética  $\pm$  error típico de los datos obtenidos en cada uno de los ensayos.

La distribución normal de los datos se comprobó mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*. Tras conocer la homocedasticidad de varianzas utilizando el test de *Levene*, se procedió al análisis de ANOVA, seguido del test de *Tukey* para las comparaciones post hoc en el caso de varianzas homogéneas, o de *T2* o *Tamhane* en caso de que éstas no cumplieran la condición de homogeneidad. Los ANOVAs fueron de una o dos vías, dependiendo de las variables dependientes consideradas en cada diseño experimental. Así, por ejemplo, se realizaron ANOVAs de dos vías siendo los factores edad (adulta, vieja y longeva), tratamiento (controles, dieta sin antioxidantes y con antioxidantes) y dosis (con LPS y con PBS), y en aquellos casos en los que los datos no seguían una distribución normal se llevó a cabo el test de *Kruskall-Wallis* cuando se analizaban más de dos grupos, y la prueba de la U de *Mann-Whitney* cuando se comparaban sólo dos grupos. El test de Chi cuadrado se empleó para analizar los datos cualitativos (en el apartado de las pruebas de conducta).

La evaluación de la supervivencia, se llevo a cabo mediante el test de *Kaplan-Meier*, y el estadístico que se utilizó para hacer las comparaciones fue el *Log Rank*. El nivel de significación se estableció de acuerdo con el siguiente criterio:  $p < 0,05$  significativo;  $p < 0,01$  muy significativo;  $p < 0,001$  altamente significativo.

## ***Materiales y métodos***

---

#### **4. Resultados**

**4.1. Estudio de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras adultas, maduras, viejas y longevas, así como su supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*.**

***4.1.A. Efecto de la administración de LPS (50 mg/kg) en ratonas adultas, maduras, viejas y longevas.***

En este apartado se expondrán los resultados correspondientes al efecto del shock endotóxico, generado por la administración de 50 mg/kg de LPS de *E.coli* en diversos parámetros funcionales y de estrés oxidativo, así como, los % de diferentes poblaciones en leucocitos peritoneales de ratonas ICR-CD1, a cuatro edades diferentes: adultas (36±2 semanas de edad), maduras (52±2 semanas de edad), viejas (84±2 semanas de edad) y longevas (122±2 semanas de edad), así como la supervivencia de los animales. En todos los casos los datos se han recogido a las 0 horas antes de la administración del LPS, y a las 2 y 24 horas tras su inoculación vía intraperitoneal. Los resultados se indican en las figuras de la 21 a la 31 y en las tablas de la 3 a la 15. Los parámetros se han agrupado con el siguiente orden:

- En primer lugar, se indican los *parámetros de funcionalidad* analizados directamente en macrófagos, como la capacidad de movilidad espontánea, quimiotaxis y de fagocitosis, así como aquellos que aunque tengan lugar en linfocitos, y estén analizados en la población peritoneal total, corresponden de forma más relevante a los macrófagos, como son los niveles

intracelulares de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). A continuación, se muestran los resultados de las funciones correspondientes a los linfocitos, esto es, la movilidad espontánea, quimiotaxis y la capacidad de linfoproliferación. Posteriormente se mencionará la actividad NK de células peritoneales. Por último, se relacionaran los porcentajes de leucocitos con diferentes antígenos de diferenciación (CD).

- En segundo lugar, se indican los resultados de los *parámetros de estrés oxidativo*, en primer lugar lo de los compuestos antioxidantes como la actividad de la enzima catalasa y los niveles de glutatión total, y seguidamente, los de compuestos oxidantes como el anión superóxido extracelular.

En la representación gráfica de los resultados se muestran las diferencias estadísticas con respecto a las 0 horas (referencia del estado basal de los leucocitos peritoneales) de los valores obtenidos a las 2 y 24 horas. Además se indican las diferencias estadísticas con respecto a la edad adulta (edad de referencia del mejor estado inmunológico) de los valores encontrados a las otras edades estudiadas. Por otro lado, en las tablas se muestran las diferencias estadísticas antes mencionadas, y las obtenidas en cada parámetro, tras la administración del LPS, con el correspondiente en el grupo control que recibió PBS.

### **Función de los macrófagos**

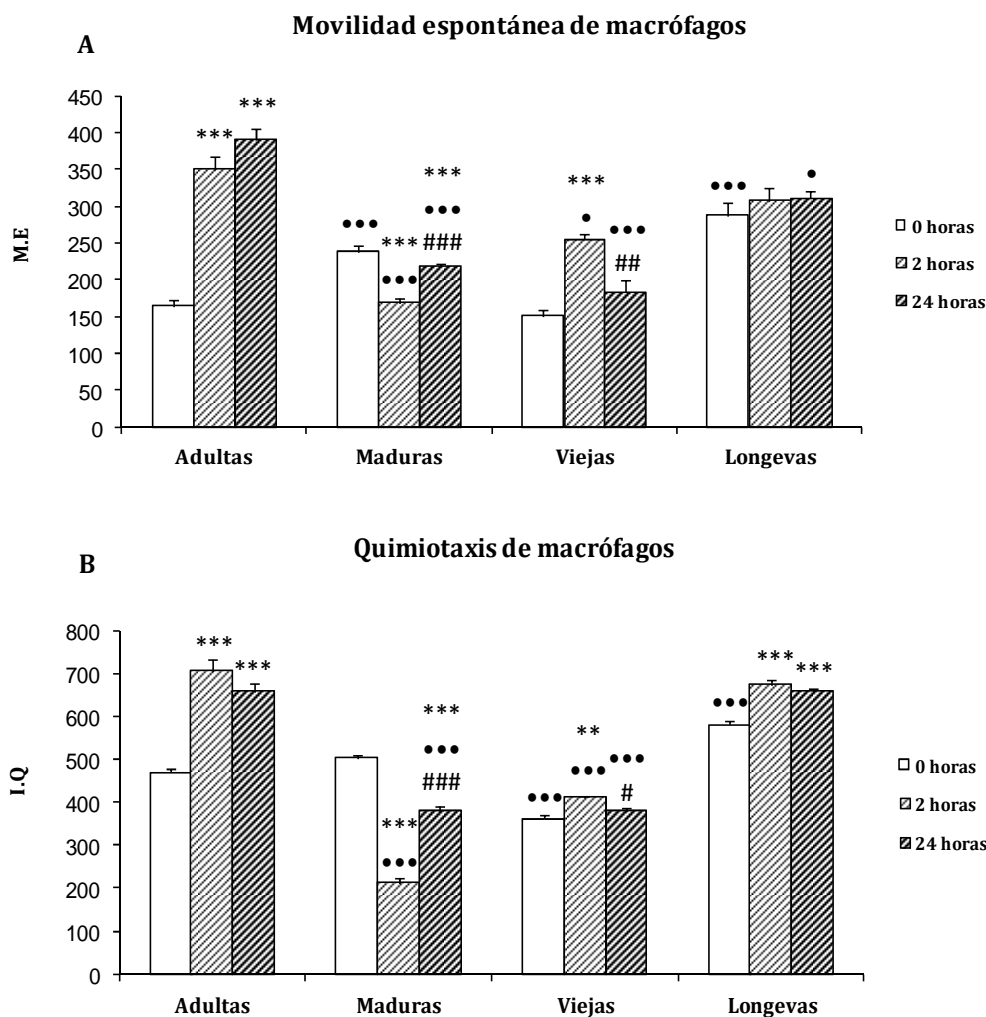
En los macrófagos se han analizado una serie de sus funciones más representativas, como la movilidad espontánea, migración hacia el foco infeccioso



(quimiotaxis), la ingestión de agentes extraños (fagocitosis) y su posterior digestión mediante la producción de radicales libres como el anión superóxido.

En la figura 21 (A y B) y las tablas (3 y 4), se recogen los datos obtenidos en relación a la *movilidad espontánea* (M.E) e *índice de quimiotaxis* (I.Q) de macrófagos peritoneales (expresados como macrófagos en la cara inferior del filtro) a las diferentes edades analizadas. Los resultados obtenidos de la movilidad espontánea de los macrófagos peritoneales se recogen en la figura 21 A y tabla 3. En este parámetro se observó un aumento ( $p<0,001$ ) en maduros y longevas con respecto a las adultas a tiempo basal. Con respecto a ese tiempo de 0 horas, se observó un incremento significativo en adultas a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ), y en viejas a las 2 horas ( $p<0,001$ ); sin embargo, el grupo de maduras mostraron una disminución significativa tanto a las 2 como a las 24 horas ( $p<0,001$ ). Por su parte, en longevas no presentaron cambios en esta función tras la administración el LPS. A las 24 horas en relación con las 2 horas apareció un aumento ( $p<0,001$ ) en maduras y una disminución ( $p<0,001$ ) en viejas.

Al comparar la movilidad espontánea de maduras, viejas y longevas con shock endotóxico en relación a las adultas con shock endotóxico, se observó que el grupo de edad madura experimentó una disminución significativa ( $P<0,001$ ) a las 2 y 24 horas, al igual que se presentó en las viejas con una bajada de esta función a las 2 ( $P<0,05$ ) y 24 horas ( $P<0,001$ ). En la edad longeva apareció una disminución a las 24 horas ( $P<0,05$ ) con respecto a las adultas.



**Figura 21. Movilidad espontánea (M.E) (A) e índice de quimiotaxis (I.Q) (B) de macrófagos peritoneales (número de macrófagos por filtro) de ratonas ICR/CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •  $P < 0,05$ , ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas.**

En relación a las comparaciones obtenidas de los grupos con shock endotóxico y sus correspondientes grupos controles (que recibieron PBS) (tabla 3), se observó que las adultas y longevas mostraron un aumento estadísticamente significativo a las 2 y 24 horas ( $p < 0,001$  a las 2 y 24 horas en adultas y longevas y

$p<0,01$  a las 2 horas en longevas), mientras que los grupos de maduras y viejas presentaron ese aumento ( $p<0,001$ ) sólo a las 2 horas.

**Tabla 3.** Movilidad espontánea (M.E) (número de macrófagos en filtro), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	164±8b	283±8***	151±9	288±16***
	PBS	252±14	275±18	144±5**	290±14
2 horas	LPS	350±17***c	168±6***c	255±7***c	308±16b
	PBS	153±6***	238±10***	148±6	212±2***
24 horas	LPS	390±16***c	218±4***###	183±17***##	311±10c
	PBS	166±9***	247±8***	143±6	226±5***

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. • $P<0,05$ , ••  $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P<0,01$ , ### $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).

En la figura 21 B y la tabla 4, corresponden a los índices de quimiotaxis. Se observó un aumento progresivo de esta función en el grupo de adultas y longevas tras la administración del LPS, que da lugar a la aparición de diferencias estadísticamente significativas a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ) en relación al tiempo 0 horas, mientras que en el grupo de viejas la significación estadística apareció únicamente a las 2 horas ( $p<0,01$ ). Inversamente, el grupo de maduras exhibieron un descenso significativo a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ). Comparando los resultados a 24 horas con las 2 horas se apreció un aumento en las maduras ( $p<0,001$ ) y un descenso en las viejas ( $p<0,05$ ). Al comparar los resultados en las maduras, viejas y longevas con los correspondientes en adultas, se observó que al tiempo 0 horas, esto es en estado previo a la administración del LPS, las células de las viejas tenían

una menor quimiotaxis ( $p<0,001$ ), mientras las de las longevas con mayor ( $p<0,001$ ). A las 2 y 24 horas de administración de la endotoxina, los macrófagos de maduras y viejas muestran menores índices de quimiotaxis ( $p<0,001$ ) que las de las adultas. Por su parte, las células de las longevas expresaron unos I.Q semejantes a las de adultas, cuando se comparan los grupos con endotoxemia y sus respectivos grupos controles (PBS) (tabla 4), tanto en adultas, como en viejas y longevas encontramos que el índice de quimiotaxis es, significativamente mayor, en los animales con LPS ( $p<0,001$ ,  $p<0,05$ ,  $p<0,001$ , respectivamente) con la excepción de en viejas a las 24 horas; mientras que en las maduras se encontró una disminución ( $p<0,001$ ).

**Tabla 4.** Índice de quimiotaxis (I.Q) (número de macrófagos por filtro), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	470±10	504±8	362±10•••	581±10•••
	PBS	458±10	515±6•	361±10•••	551±17•
2 horas	LPS	705±30***c	213±9•••***c	412±2•••**a	675±11***c
	PBS	438±6	523±16•	351±11••	557±8•••
24 horas	LPS	659±18***c	379±11•••***###c	380±7•••#	657±10***c
	PBS	402±17*	507±12	357±9••	540±9•••

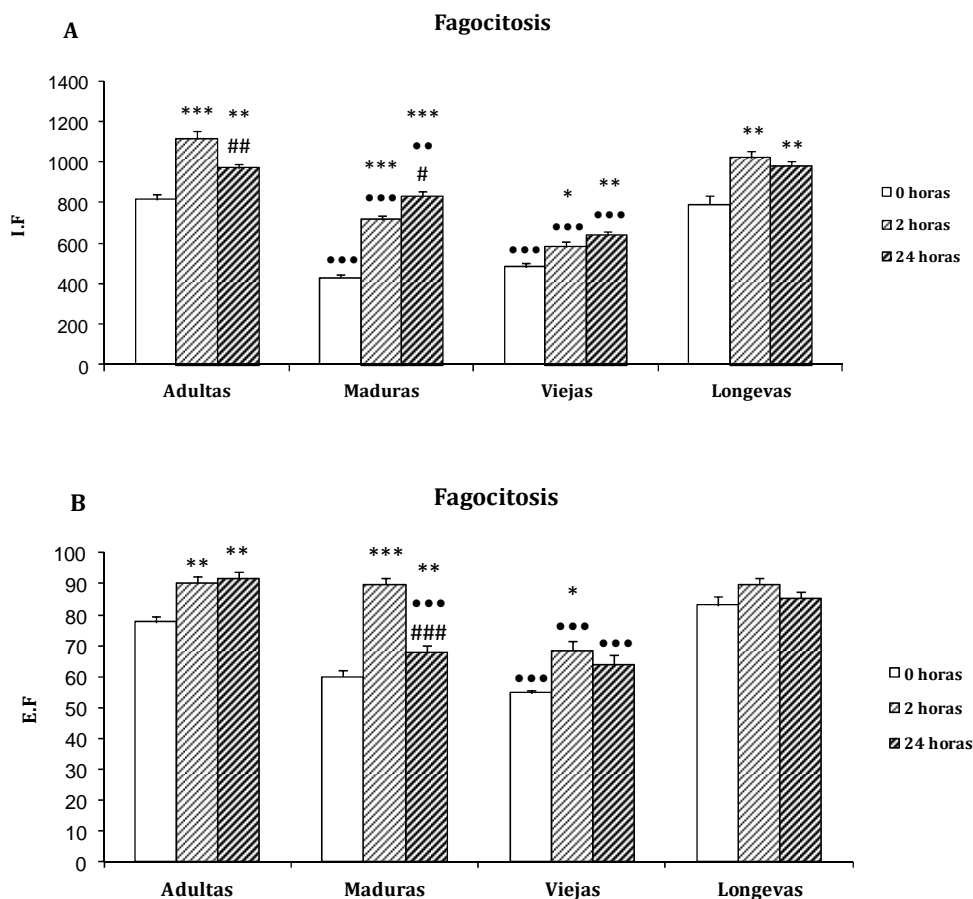
Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. • $P<0,05$ , ••  $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \*  $P<0,05$  \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P<0,05$ , ### $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P<0,05$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).

En cuanto a la *fagocitosis*, los resultados de índice y eficacia fagocítica se muestran en la figura 22A y tabla 5 y en figura 22B y tabla 6, respectivamente. Se observó con respecto al valor obtenido en estado basal (0 horas), una elevación

significativa de estas funciones a las 2 y 24 horas, en todas las edades con excepción en lo que respecta a la eficacia fagocítica en longevas y a las 24 horas en viejas. A las 24 horas con respecto a las 2 horas, se observó un descenso significativo ( $p<0,01$ ) en adultas y un aumento ( $p<0,05$ ) en maduras para I.F. y un descenso ( $p<0,001$ ) en la maduras en la E.F. En comparación con las adultas a tiempo 0 horas, se dio una disminución en maduras y viejas ( $p<0,001$ ), pero las longevas mostraron valores similares. A las 2 y 24 horas también se dieron valores menores en maduras y viejas (con excepción de maduras la E.F) y similares a la de adultas con las longevas.

En lo que respecta a los resultados obtenidos tanto para el índice y la eficacia fagocítica, entre los grupos que recibieron el LPS y sus respectivos controles (PBS)(tablas 5 y 6), se observó un aumento a las 2 y 24 horas en adultas ( $p<0,001$ ) y maduras ( $p<0,001$ ). También en longevas se apreció un aumento ( $p<0,001$ ) a las 2 horas en I.F. No se encontraron diferencias significativas entre los animales viejos.

Los resultados correspondientes a los niveles intracelulares de *anión superóxido* ( $O_2^-$ ) (nmol/ $10^6$  células), indicativos de la capacidad de destrucción del material extraño fagocitado por los macrófagos se muestran en la figura 23 y la tabla 7. Se observó a las 2 y 24 horas, en general, que tras la administración de la endotoxina se da un aumento de estos niveles, tanto en basales (con excepción a las 24 horas en viejas y longevas) como en la estimulada (con excepción en las maduras). Los valores a 24 horas con respecto a las de 2 horas se observó sólo en longevas, en los valores basales, en la que se apreció una disminución ( $p<0,001$ ).



**Figura 22.** Índice de fagocitosis (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos) (A) y eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos) (B), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P < 0,05$ , ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas.

Cuando se comparan los valores en relación a los obtenidos en las adultas, se observó que a tiempo 0 h, no hay una diferencias significativas entre las edades en el  $O_2^-$  basal y una disminución en viejas ( $p < 0,01$ ), en los niveles de anión superóxido estimulado. En los niveles basales de  $O_2^-$ , se apreció una disminución con diferencias significativas a las 2 y 24 horas en viejas y a las 24 horas en longevas con respecto al grupo de adultas. Los niveles tras la estimulación con las

partículas de látex, mostró una diferencias en viejas (una disminución), y a las 2 y 24 horas en longevas (un aumento).

**Tabla 5.** Índice de fagocitosis (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

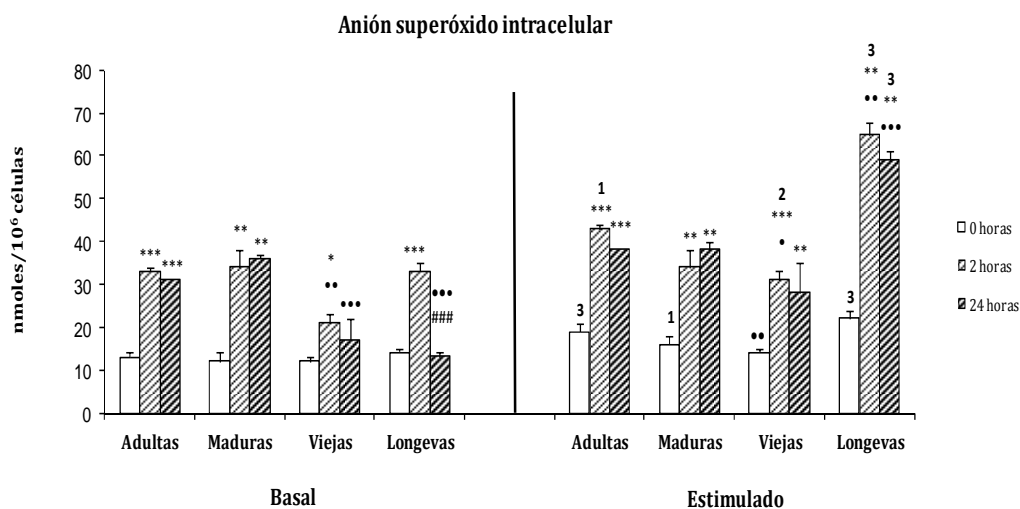
Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	814±26	431±11●●●	483±21●●●	792±41b
	PBS	695±22	364±16●●●	559±21●●	532±23●●
2 horas	LPS	1116±37***c	715±20●●●***c	581±29●●●*	1022±29**c
	PBS	695±23	341±8●●●	629±35	696±33*
24 horas	LPS	971±21**##c	833±24●●***#c	638±18●●●**	980±25**
	PBS	638±18	369±14●●●	583±20	724±61**

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ●●  $P<0,01$ , ●●●  $P<0,001$  con respecto al valor del grupo de edad adulta. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P<0,05$ , ##  $P<0,01$ , ###  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 2 horas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).

**Tabla 6.** Eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	78±2	60±2●●	55±1●●●	83±3
	PBS	69±5	52±2	67±2	70±4
2 horas	LPS	90±2**c	90±2***c	68±3●●●*	90±2
	PBS	61±4	49±2	62±2	84±2
24 horas	LPS	92±2**c	68±2●●●***##a	64±3●●●	85±2
	PBS	62±3	56±1	58±2	85±3●●*

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ●●  $P<0,01$ , ●●●  $P<0,001$  con respecto al valor del grupo de edad adulta. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 0 horas. ###  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 2 horas. a  $P<0,05$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).



**Figura 23. Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y bajo la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 0 horas. ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P < 0,05$ , •• $P < 0,01$ , ••• $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. 1  $P < 0,05$ , 2  $P < 0,01$ , 3  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en basales.

En cuanto a las diferencias de los grupos con shock endotóxico (LPS) y sus respectivos grupos controles (PBS) (Tabla 7), estadísticamente los niveles tanto basales como estimulados con las partículas de látex son mayores, en general en todos los grupos estudiados con shock endotóxico, tanto a las 2 como a las 24 horas (con excepción de las 24 horas en longevas). Los niveles más elevados de anión superóxido intracelular estimulado se observaron en el grupo de las longevas ( $p < 0,001$ ).



**Tabla 7.** Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^-$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y tras la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	CDC	Control			
			Edad (meses)			
			Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
			9	13	21	>30
0 horas	PBS	Basal	14±2	11±1	9±2•	12±2
		Estimulado	18±1	14±2	12±3	17±3
	LPS	Basal	13±1	12±1	12±2	14±1
		Estimulado	19±2	16±2	14±1••	22±2
2 horas	PBS	Basal	24±1	8±1•••	8±1•••	11±1••
		Estimulado	28±1	13±1•••	12±1•••	15±1••
	LPS	Basal	33±1***b	34±4**c	21±2••*c	33±2***c
		Estimulado	43±1***c	34±4**b	31±2•**b	65±3••***c
24 horas	PBS	Basal	23±1	8±1•••	9±1•••	12±1••
		Estimulado	27±2	13±1••	10±1•••	16±1••
	LPS	Basal	31±1***a	36±5**c	17±1•••b	13±1•••###
		Estimulado	38±2***a	38±7**b	28±2**b	59±2•••**c

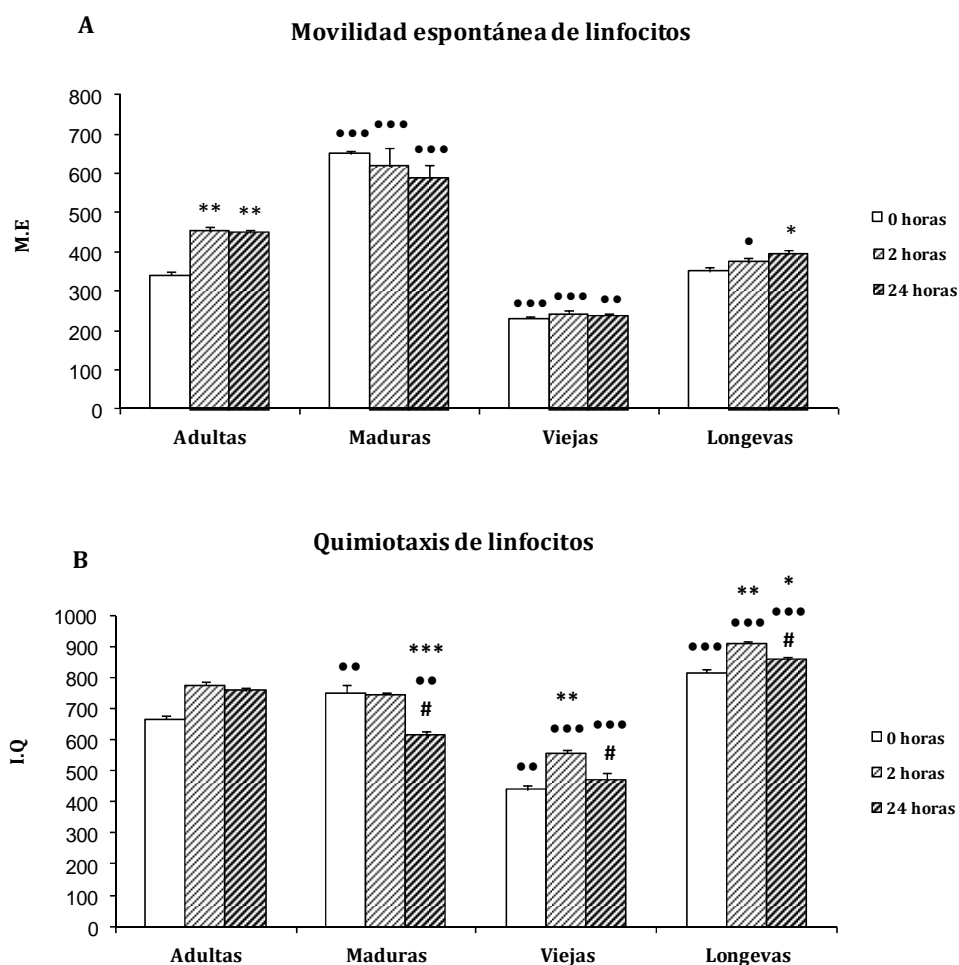
Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al valor del grupo de edad adulta. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 0 horas. ### $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 2 horas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS). CDC: Capacidad digestiva celular.

### **Función de los linfocitos**

Las funciones analizadas en linfocitos han sido su capacidad de migración espontánea o a un foco antigénico (quimiotaxis), así como la proliferación tanto basal como en respuesta a los mitógenos Con A y LPS (figuras 24 y 25 y tablas de la 8 a la 10).

Con respecto a los resultados obtenidos para la *movilidad espontánea* (fig. 24 A y tabla 8) después del inducir el shock endotóxico, se observó un aumento en adultas a las 2 y 24 horas ( $p<0,01$ ) y en longevas a las 24 horas ( $p<0,05$ ). En cuanto

a los cambios que se aprecian en estos grupos con sepsis, en comparación a sus respectivos controles (PBS) (tabla 8), se observaron valores mayores en el grupo de adultas y maduras con shock a las 2 ( $p<0,001$  en adultas y  $p<0,01$  en maduras) y 24 ( $P<0,01$ ), mientras que los grupos de viejas y longevas no muestran diferencias significativas.



**Figura 24. Movilidad espontánea (M.E) (A) e índice de quimiotaxis (I.Q) (B) de linfocitos peritoneales (número de linfocitos por filtro) de ratonas ICR/CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P<0,05$ , con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , ••  $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas.**

**Tabla 8.** Movilidad espontánea (M.E) (número de macrófagos por filtro), de linfocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	342±9	650±6***	230±7***	350±10
	PBS	323±5	630±28***	259±8**	348±14
2 horas	LPS	454±9**c	620±47***	243±9***	375±12•
	PBS	344±10	595±20**	261±7***	332±11
24 horas	LPS	450±8**b	589±32***	237±8**	394±13*
	PBS	354±17	555±28***	243±7**	330±12

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (PBS).

Con respecto a la *capacidad de quimiotaxis* de los linfocitos peritoneales (figura 24 B y tabla 9) tras la administración del LPS, se observó un aumento de esta función, a las 2 horas en viejas ( $p<0,01$ ), y a las 2 y 24 horas en longevas ( $P<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente), en comparación con sus respectivas 0 horas. No obstante, en maduras esta función apareció disminuida ( $p<0,001$ ) a las 24 horas, y no mostró cambios relevantes en el grupo de adultas. Comparando los resultados obtenidos a las 24 horas con las 2 horas tras la administración del LPS, se apreció una disminución ( $p<0,05$ ) en maduras, viejas y longevas. En referencia a los cambios entre las maduras, viejas y longevas con las adultas a tiempo 0 horas, se apreció un aumento en maduras y longevas ( $p<0,001$ ) y una disminución en viejas ( $p<0,01$ ). A las 2 horas se observó una menor quimiotaxis en viejas ( $p<0,001$ ), y a las 24 horas en maduras ( $p<0,01$ ) y en viejas ( $p<0,001$ ). Por el

contrario, el grupo de longevas presentaron un aumento significativo tanto a las 2 como a las 24 horas ( $p<0,001$ ).

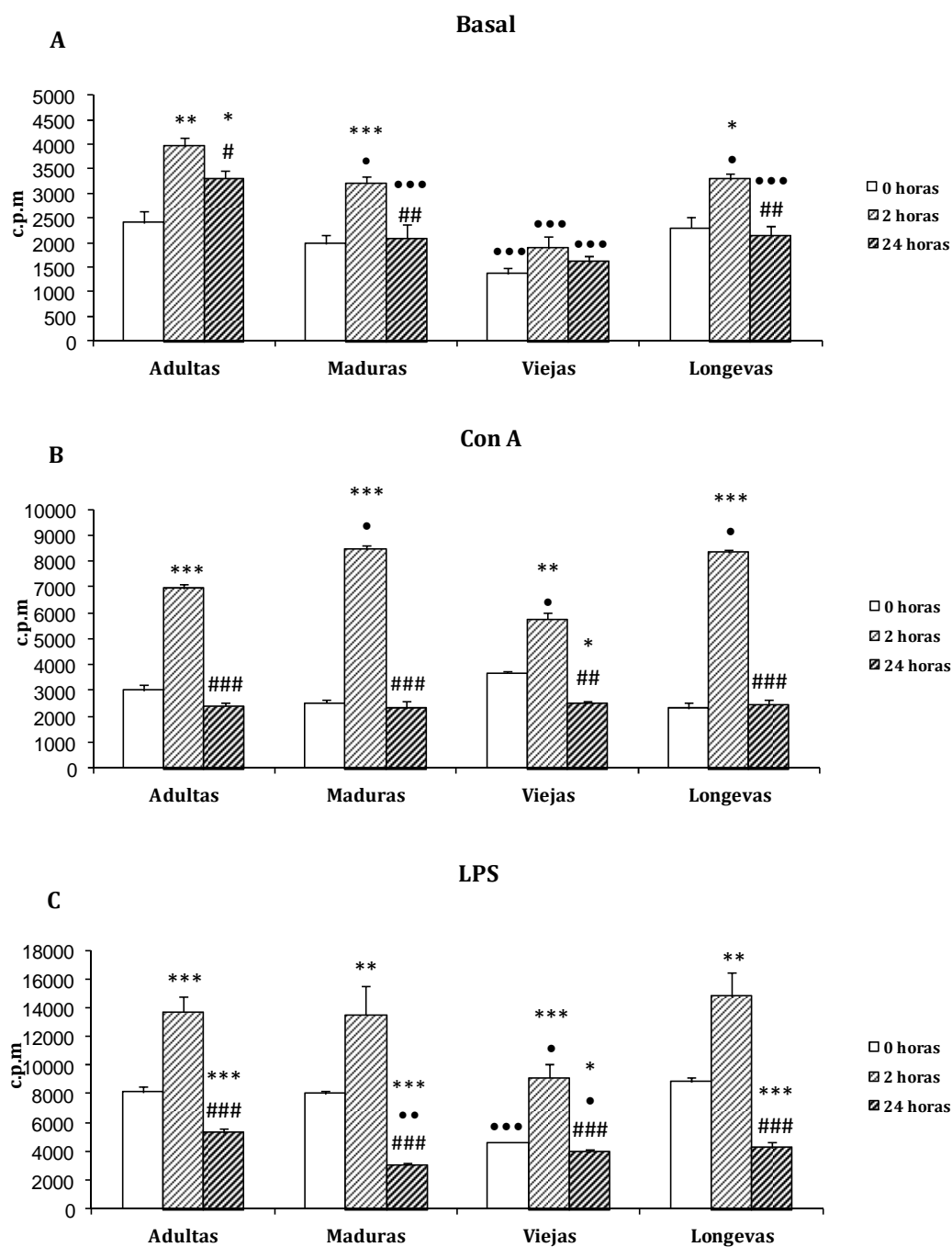
Al comparar los resultados en los animales con shock endotóxico con sus respectivos grupos controles (PBS) (tabla 9), se apreció un incremento altamente significativo en el grupo de adultas que recibieron la endotoxina a las 2 y 24 horas ( $P<0,001$ ), mientras que el grupo de viejas lo que fue a las 2 horas y en el de longevas a las 2 y 24 horas.

**Tabla 9.** Índice de quimiotaxis (I.Q) (número de macrófagos por filtro), de linfocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	666±9	750±25••	441±10••	816±12•••
	PBS	679±8	729±12	449±19•••	808±14•••
2 horas	LPS	776±10***c	746±4	556±10•••**c	910±7•••**c
	PBS	616±15**	634±18**	436±9•••	727±10•••**
24 horas	LPS	758±10**c	615±10••***#	471±22•••#	858±10•••*#b
	PBS	556±12***	548±15***##	435±9••	755±10•••*

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ••  $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P<0,01$ , #  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).

En relación a los resultado de la *linfoproliferación* (figura 25 y tabla 10), si se considera la que tiene lugar a nivel basal (figura 25 A), la administración de LPS la aumentó, respecto al tiempo 0 horas, a las 2 horas en adultas ( $p<0,01$ ), maduras ( $p<0,001$ ) y longevas ( $p<0,05$ ) y a las 24 horas también en adultas ( $p<0,05$ ). Si se compara los resultados a las 24 horas con relación a las 2 horas, se observaron una disminución en adultas ( $p<0,05$ ), maduras y longevas ( $p<0,01$ ).



**Figura 25. Linfoproliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal) (A), y estimulados con concanavalina A (ConA) (B) y lipopolisacárido (LPS) (C), procedentes de ratonas ICR/CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P < 0,05$ , ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas.**

En lo que respecta a la comparación de los resultados obtenidos a las diferentes edades con la adulta, se observó que a tiempo 0 horas una disminución en viejas ( $p<0,001$ ). A las 2 y 24 horas hay una disminución en todas las edades maduras, longevas ( $p<0,05$  a las 2h y  $p<0,001$  a las 24h) y en viejas ( $p<0,001$ ).

Al comparar los resultados obtenidos en los grupos con shock endotóxico y sus correspondientes controles con PBS (tabla 10), a las 0 horas no se observaron diferencias significativas en todas las edades. Sin embargo, si se compara los resultados obtenidos, tras la inoculación del LPS, a las 2 y 24 horas, se apreció un aumento en adultas ( $p<0,001$ ) y en longevas ( $p<0,001$  a las 2 h).

Los resultados obtenidos cuando la linfoproliferación es estimulada por el mitógeno Con A, específico para linfocitos T, se observó un aumento, con relación al tiempo 0 horas, a las 2 horas en adultas ( $p<0,001$ ), maduras ( $p<0,001$ ), viejas ( $p<0,01$ ) y longevas ( $p<0,001$ ), tras recibir la inoculación del LPS. Al comparar los resultados a las 24 horas con respecto a las 2 horas, se apreció una disminución en adultas, maduras, viejas y longevas ( $p<0,001$ ). En lo que respecta a la comparación de los resultados obtenidos a las diferentes edades con la adulta, se observó que a las 2 horas una disminución en viejas ( $p<0,05$ ) y un aumento en maduras y longevas ( $p<0,05$ ). Por otro lado, la linfoproliferación estimulada con LPS, específico para linfocitos B, mostró un aumento significativo a las 2 horas en adultas ( $p<0,001$ ), maduras ( $p<0,01$ ), viejas ( $p<0,001$ ) y longevas ( $p<0,01$ ) y una disminución a las 24 horas en adultas, maduras, longevas ( $p<0,001$ ) y en viejas ( $p<0,05$ ), con respecto a las 0 horas. Si contrastamos las 24 horas con relación a las 2 horas, se observaron disminuciones en todos los grupos de edad ( $p<0,001$ ). Al

comparar los grupos de edad con la edad adulta, se observó que a tiempo 0 horas hay una disminución en viejas ( $p<0,001$ ) y a las 2 y 24 horas en maduras ( $p<0,01$  a las 2 h) y también en viejas ( $p<0,05$ ).

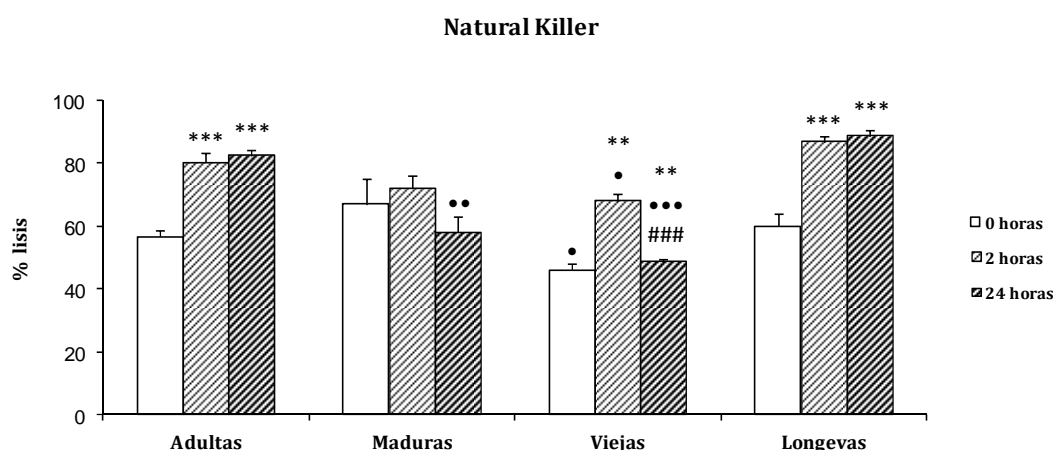
**Tabla 10.** Linfoproliferación (LP) (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal), y estimulados con concanavalina A (Con A) y lipopolisacárido (LPS), procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	LP (c.p.m)	Control			
		Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	Basal	2409±119	1775±140	1634±106	2316±132
	Con A	1737±116	1535±112	3017±197••	1613±125
	LPS	5812±241	4115±192••	4010±194••	7051±233••
2 horas	Basal	1913±181**	2689±129•**	1654±78	1961±181
	Con A	3414±144***	5230±246•••••	5625±225•••••	3558±126***
	LPS	7238±341**	13851±2724•••**	9471±171***	7670±75
24 horas	Basal	1485±130##	2414±131••*	1724±192	1728±104
	Con A	2373±276#	2464±149*#####	4879±203••**	2087±139##
	LPS	5622±219##	4710±228##	5309±253*####	6123±205*#
		Shock			
0 horas	Basal	2415±218	1980±162	1377±98•••	2301±213
	Con A	3017±197b	2503±426	3665±134	2323±356
	LPS	8135±340c	8000±240c	4611±87•••	8831±301c
2 horas	Basal	3970±156**c	3212±149•***	1910±228•••	3297±116•*c
	Con A	6943±196***c	8448±394•***c	5760±213•**	8356±467•***c
	LPS	13699±1043***b	13492±2057**	9121±946•***	14811±1636**b
24 horas	Basal	3305±168*#c	2087±294•••##	1612±104•••	2142±203•••##
	Con A	2388±329###	2289±138####	2510±265*###b	2432±110####
	LPS	5266±289***###	3085±109••***####a	3905±219•*####a	4244±439***####a

Se muestra la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ••• $P<0,001$ , ••  $P<0,01$ , • $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \*\*\* $P<0,001$ , \*\*  $P<0,01$ , \*  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #### $P<0,001$ , ##  $P<0,01$ , #  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).

### Actividad natural killer (NK) de leucocitos

En lo que respecta a la *actividad natural killer* (NK) (expresada como % lisis) de los leucocitos peritoneales, los resultados se muestran en la figura 26 y la tabla 11. El efecto de la administración del LPS a las 2 y 24 horas de la misma, supuso un aumento de la actividad NK en adultas y longevas ( $p < 0,001$ ). En las viejas, se dio un aumento a las 2 horas y una disminución a las 24 horas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 26. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de leucocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P < 0,05$ , •• $P < 0,01$ , ••• $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas.

Comparando las 24 horas con las 2 horas sólo se apreciaron diferencias significativas en las viejas, con una disminución del porcentaje de lisis ( $p < 0,001$ ). En relación a los valores obtenidos en adultas, si consideramos las 0 horas, se observó una disminución en viejas ( $p < 0,05$ ), y tras la administración del LPS, en maduras y viejas hay menor actividad NK, especialmente en maduras y en viejas a las 24 horas ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). Si comparamos los resultados



obtenidos de los animales con shock endotóxico con los controles que se les administró el PBS (tabla 11), se observó un aumento con diferencias estadísticamente significativas en las adultas a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ), en viejas a las 24 horas ( $p<0,01$ ), y longevas a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$  y  $p<0,01$ ).

**Tabla 11.** Actividad “Natural killer” (NK) (% lisis) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal), y estimulados con concanavalina A (Con A) y lipopolisacárido (LPS), procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	57±2	67±8	46±2•	60±4
	PBS	60±2	75±1•	61±2	66±2
2 horas	LPS	80±3***c	72±4	68±2•**	87±2***c
	PBS	56±2	72±2••	67±4•	69±2•
24 horas	LPS	82±2***c	58±5••	49±1•••**###b	89±2***b
	PBS	55±2	70±2•••*	69±2••	70±2•••

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ### $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).

### Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria

Los resultados correspondientes a los % de células peritoneales que expresan diferentes antígenos de diferenciación leucocitaria de membrana (CD) (CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b y CD45RA), se muestran en la tabla 12.

El porcentaje de células **CD3** de leucocitos totales, aumento significativamente a las 2 horas de la administración del LPS en adultas y maduras, y a las 24 horas en maduras y viejas, mientras que a este tiempo disminuyó en

adultas. Así, comparando las 24 horas con las 2 horas, hay una disminución en adultas y un aumento en maduras y viejas.

**Tabla 12.** Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD4, CD3, CD8, CD19, CD11b y CD45RA (%) en leucocitos peritoneales murinos, procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

	Tiempo	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
% CD3	0 horas	13,89±0,22	3,7±0,40c	1,81±0,09c	2,35±1,28c
	2 horas	20,79±0,92***	7,99±0,90*c	2,16±0,73c	3,32±0,99c
	24 horas	8,11±0,64***###	13,99±0,33***###b	7,50±1,06***##	5,19±0,67
% CD4	0 horas	7,52±0,46	4,57±0,31	4,99±0,76	4,74±0,53
	2 horas	6,90±0,18	5,76±0,55	9,69±1,28*	9,66±0,65*
	24 horas	7,37±0,03	3,82±0,00	11,99±1,98***a	6,22±0,76
% CD8	0 horas	3,06±0,20	4,29±0,59	3,03±0,38	7,93±1,30a
	2 horas	3,96±0,91	8,59±0,19*a	6,34±0,55	7,20±0,60a
	24 horas	3,10±1,01	3,80±0,95#	7,56±0,76*a	2,73±0,70***#
% CD11b	0 horas	14,72±0,51	3,74±0,40c	1,81±0,90c	2,35±1,28c
	2 horas	14,08±0,01	7,99±0,90b	2,16±0,73c	3,32±0,99c
	24 horas	8,11±0,64#	13,99±0,33***#a	7,50±1,06*#	5,19±0,67
% CD19	0 horas	48,18±3,09	43,95±0,66	51,18±0,80	61,74±0,80c
	2 horas	36,30±0,48**	22,40±0,37**b	22,61±1,26***b	41,40±0,02*a
	24 horas	33,38±0,59***	24,26±0,7**b	14,60±0,74***c	31,45±0,87***##
% CD45RA	0 horas	72,81±0,19	71,17±7,86	96,47±0,84c	84,86±1,70b
	2 horas	73,92±0,16	74,46±5,37	57,76±1,88***b	36,65±0,78***c
	24 horas	81,57±0,62	44,67±2,10***###c	43,30±0,56***##c	8,08±2,24***###c
% CD8/CD3	0 horas	6,79±0,19	2,18±1,11b	1,80±1,07b	6,97±3,76
	2 horas	2,77±0,99*	5,52±1,45	2,56±1,08	7,96±0,36b
	24 horas	5,36±0,40	4,96±0,93	10,77±1,43***###b	4,83±1,49

Los datos son la media ± el error estándar de 2 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizado por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto a las 0 horas, #  $P<0,05$ , ##  $P<0,01$ , ###  $P<0,001$  con respecto a las 2 horas y a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a los adultas.

En lo que respecta, a las comparaciones de los resultados en maduras, viejas y longevas con los obtenidos en adultas, se encontró que a tiempo 0 y 2 horas, hay menores porcentajes en todas esas edades. A Las 24 horas únicamente se dieron diferencias en maduras, en las que se apreció un aumento. El porcentaje

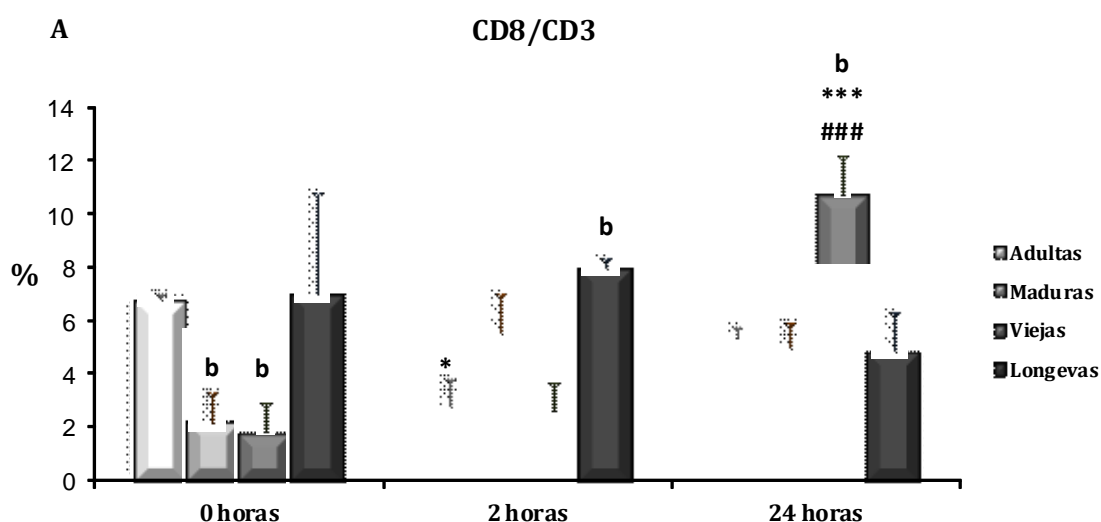
de linfocitos T **CD4** se mantuvo sin cambios globalmente en lo referente al tiempo tras la administración de LPS, con excepción del grupo de viejas que presentaron un incremento a las 2 y 24 horas tras la endotoxemia y las longevas a las 2 horas. Comparando con adultas, sólo se observó un aumento a las 24 horas en viejas.

El shock endotóxico sólo produjo cambios en el porcentaje de células **CD8+** en maduras a las 2 horas y en viejas a las 24 horas, dándose una disminución a las 24 horas en longevas. A las 24 horas en comparación con las 2 horas, se encontró una disminución de estos % en maduras y en longevas. En comparación con los datos en adultas, tuvo lugar un aumento en maduras y longevas a las 2 horas y en viejas a las 24 horas.

Con respecto al % de células que expresan **CD11b** (macrófagos), el shock endotóxico no indujo cambios a las 2 horas en todos los grupos de edad, sin embargo, hay una leve tendencia al aumento en el grupo de animales de edad madura ( $P=0,073$ ). A las 24 horas se observó un aumento significativo en esta edad ( $P<0,001$ ) y en viejas ( $P<0,05$ ) con respecto a las 0 horas y con respecto a las 2 horas. Si nos centramos en los cambios que aparecen en las diferentes edades con respecto a las adultas, se observaron disminuciones significativas a las 0 y 2 horas en todos los grupos, y un aumento a las 24 horas en maduras.

En los porcentajes de células con el marcador para **CD19** (linfocitos B), se apreciaron disminuciones significativas a las 2 y 24 horas con relación a las 0 horas en todos los grupos experimentales, y una disminución a las 24 horas con respecto a las 2 horas en las longevas. En lo que respecta a las comparaciones con la edad adulta, las maduras y viejas tuvo lugar una disminución del % de CD19 a las 2 y 24 horas del shock endotóxico, por el contrario, en las longevas se observaron valores más elevados.

En cuanto a los linfocitos T que expresan **CD45RA**, antígeno específico de células *naïve*, se observó una disminución en el porcentaje de dichas células, tras la administración del LPS en maduras a las 24 horas ( $P<0,001$ ), y en viejas y longevas a las 2 y 24 horas ( $P<0,001$ ). Comparando los valores con los obtenidos en la edad adulta, se observaron aumentos significativos a tiempo 0 horas en viejas y longevas, mientras que a las 2 horas se apreciaron disminuciones en estas dos edades y las 24 horas en todas las edades estudiadas.



**Figura 27.** Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria (%) CD8/CD3 en membrana de la población total de células procedentes del peritoneo de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 2 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizado por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto a las 0 horas, #  $P<0,05$ , ###  $P<0,001$  con respecto a las 2 horas y a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a los adultos.

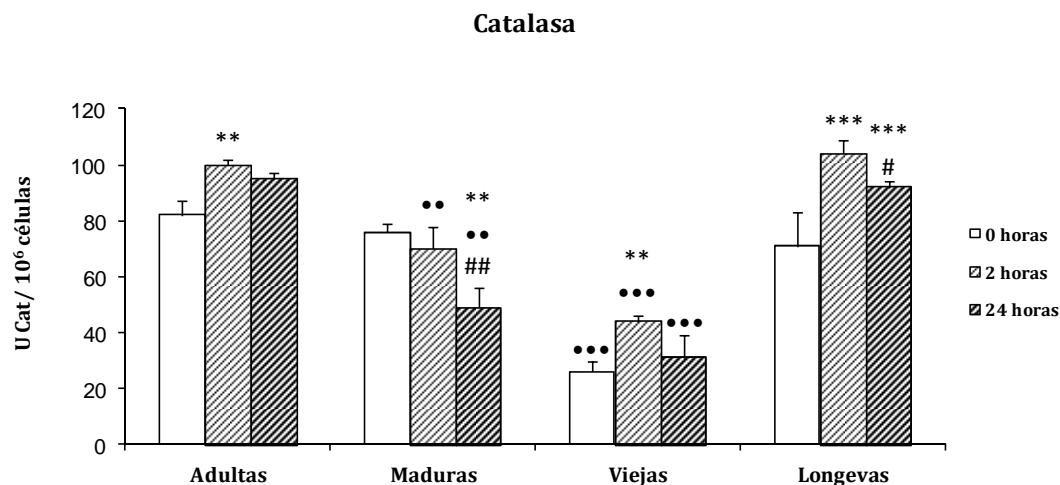
El porcentaje de leucocitos que expresan **CD3+** y **CD8+**, fundamentalmente linfocitos T citotóxicos, tras la administración del LPS, manifestó únicamente una disminución en adultas a las 2 horas y un aumento en viejas a las 24 horas, lo que

hizo que en este tiempo, fuese también significativamente mayor el % que a las 2 horas. Comparando con los resultados en adultas, las maduras y las viejas mostraron una disminución a las 0 horas, mientras en viejas tuvieron un incremento a las 24 horas y las longevas a las 2 horas, tras el shock endotóxico (fig. 27).

### **Defensas antioxidantes**

Los resultados correspondientes a las defensas antioxidantes analizadas se muestran en las figuras 28 y 29 y en las tablas 13 y 14. La *actividad enzimática catalasa* (CAT) de leucocitos peritoneales, procedentes de ratones con shock endotóxico (figura 28), aumentó a las 2 horas de la administración de LPS en adultas, viejas y longevas. A las 24 horas se dió un aumento también en longevas, pero una disminución en maduras. Al comparar los resultados de las 24 horas con los obtenidos a las 2 horas se apreció una disminución en longevas y maduras. Respecto a la edad adulta, a tiempo 0 horas, las viejas mostraron valores significativamente menores de esta enzima antioxidante. A las 2 y 24 horas las maduras y las viejas, tuvieron actividades menores de la enzima. No se dieron cambios en longevas.

Al observar los resultados obtenidos, entre los grupos con shock y sus correspondientes controles (PBS) (tabla 13), se aprecia un aumento en los animales con la endotoxemia, el cual es significativo en adultas y longevas a las 2 y 24 horas.

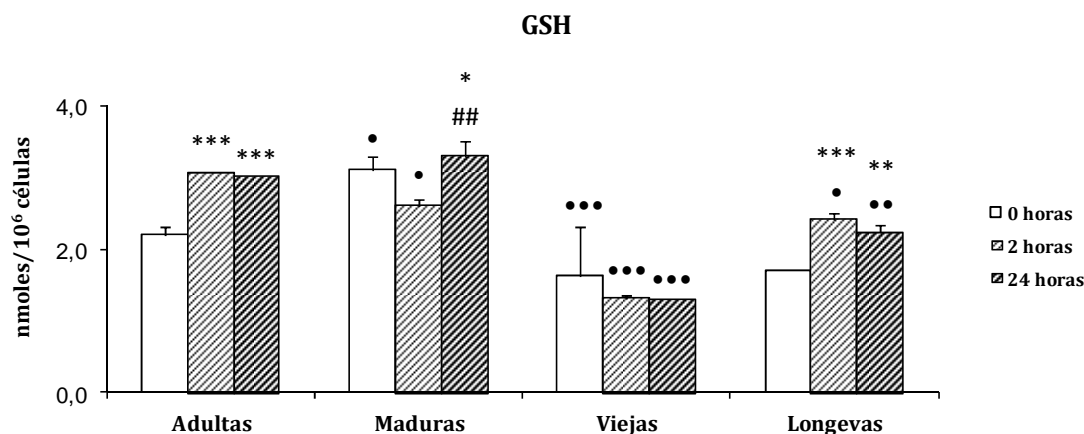


**Figura 28.** Actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) (Ucat/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P<0,05$ , ## $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas.

**Tabla 13.** Actividad de la enzima catalasa (CAT) (Ucat/10<sup>6</sup> células) de linfocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	82 $\pm$ 5	76 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4•••	71 $\pm$ 12
	PBS	75 $\pm$ 3	70 $\pm$ 2	23 $\pm$ 2•••	71 $\pm$ 10
2 horas	LPS	100 $\pm$ 2**a	70 $\pm$ 8••	44 $\pm$ 2•••**	104 $\pm$ 5***c
	PBS	76 $\pm$ 4	68 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2•••*	71 $\pm$ 2
24 horas	LPS	95 $\pm$ 2b	49 $\pm$ 7••**##	31 $\pm$ 2•••	92 $\pm$ 2***#c
	PBS	75 $\pm$ 4	65 $\pm$ 1	39 $\pm$ 4•••**	64 $\pm$ 2

Se muestra la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ••• $P<0,001$ , •• $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P<0,01$ , # $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a $P<0,05$ , b $P<0,01$ , c $P<0,001$  con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS).



**Figura 29.** Niveles de glutatión reducido (GSH) (nmoles/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al valor de la 0 horas. ##  $P < 0,01$  con respecto a las 2 horas. • $P < 0,05$ , •• $P < 0,01$ , ••• $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas.

Los resultados correspondientes al contenido *intracelular de glutatión reducido* (GSH) (expresado en nmoles/10<sup>6</sup> células) de leucocitos peritoneales de los ratones con shock endotóxico en las distintas edades estudiadas, se muestran en la figura 29 y la tabla 14. La administración de LPS, produjo un aumento significativo de los niveles de este antioxidante a las 2 y 24 horas en adultas y longevas, y las 24 horas en maduras (tiempo en el que a esta edad se apreció un aumento significativo en relación a las 2 horas). En comparación con la edad adulta, a tiempo 0 horas, tuvo lugar un aumento en maduras y una disminución en viejas. A las 2 horas se dio una disminución en todas las edades y a las 24 horas en viejas y longevas. Cuando se analizaron los resultados obtenidos de los niveles de GSH, entre los grupos que recibieron el LPS y sus correspondientes controles que recibieron PBS (tabla 14), se observaron aumentos significativos en de este antioxidante con el shock endotóxico a las 2 horas en adultas y longevas y a las 24 horas en adultas, maduras y viejas.

**Tabla 14.** Niveles de glutatión reducido (GSH) (nmoles/10<sup>6</sup> células) de linfocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Tiempo	Tratamiento	Edad (meses)			
		Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
		9	13	21	>30
0 horas	LPS	2,2±0,1	3,1±0,2•	1,6±0,7	1,7±0,0
	PBS	2,1±0,1	2,9±0,1	1,5±0,1	1,4±0,2
2 horas	LPS	3,0±0,0***b	2,6±0,1•	1,3±0,0***	2,4±0,1***b
	PBS	2,1±0,1	2,0±0,1	1,1±0,0***	1,5±0,0•
24 horas	LPS	3,0±0,0***a	3,3±0,2*##b	1,3±0,0***b	2,2±0,1***
	PBS	2,1±0,2	2,0±0,1	0,9±0,0**##	1,5±0,1•

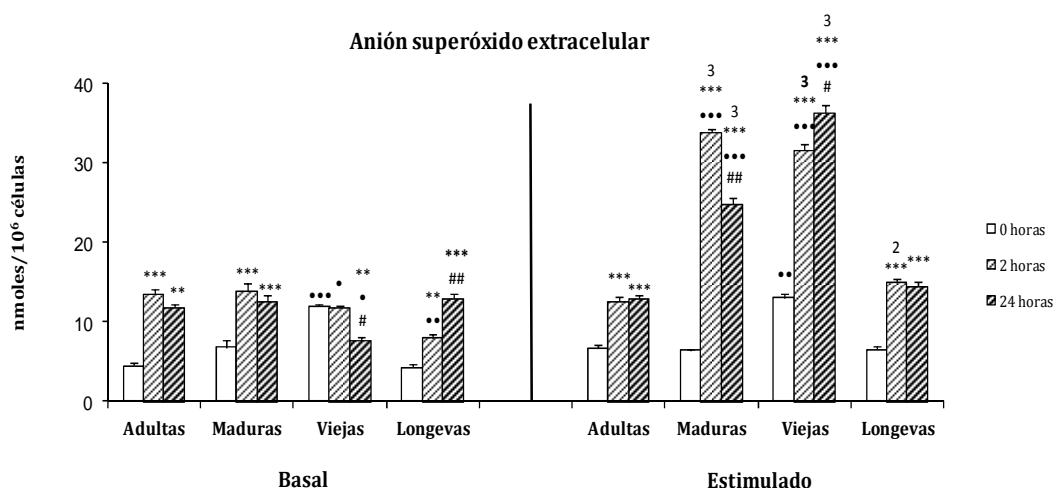
Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P<0,05$ , ##  $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$  con respecto a su correspondiente grupo control (PBS).

### Compuesto oxidante

En la figura 30 y tabla 15 se representa los niveles de *anión superóxido extracelular* ( $O_2^{\cdot-}$ ) de leucocitos peritoneales, tanto liberado en condiciones basales como en estimulación con látex. En estado basal se observaron aumentos a las 2 y 24 horas, en adultas, maduras y longevas con respecto a las 0 horas. En viejas tuvo lugar una disminución a las 24 horas. Comparando los resultados de las 24 horas con las 2 horas, se apreció una disminución en viejas y un aumento en longevas. En relación a la edad adulta se dieron disminuciones en viejas a las 2 y 24 horas y en longevas a las 2 horas. Tras la estimulación con látex, los valores aumentaron significativamente tras la administración del LPS, en comparación con la condición basal en maduras y viejas a las 2 y 24 horas y en longevas a las 2 horas. Cuando se consideran los resultados obtenidos con las células estimuladas, se apreció un aumento ( $p<0,001$ ) tras la administración del LPS en todas las edades estudiadas



(adultas, maduras, viejas y longevas) tanto a las 2 horas como a las 24 horas. Comparando los valores de 24 horas con las 2 horas, se observa una disminución en maduras y un aumento en viejas. En relación a la edad adulta a tiempo 0 horas, se dio un aumento en viejas ( $p<0,01$ ), y a las 2 y 24 horas en maduras y viejas.



**Figura 30. Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  cels) basal y bajo la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P<0,05$ , ## $P<0,01$ , ### $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. 2  $P<0,01$ , 3  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en basales.

En lo que respecta las diferencias observadas cuando se comparan los valores encontrados en los animales con shock y los controles (PBS) (tabla 15), se aprecia un aumento de los valores que resultan significativos estadísticamente, a nivel basal en adultas y longevas a las 2 y 24 horas, y en las células estimuladas en las maduras a las 24 horas y en viejas a las 2 horas.

**Tabla 15.** Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^-$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y tras la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

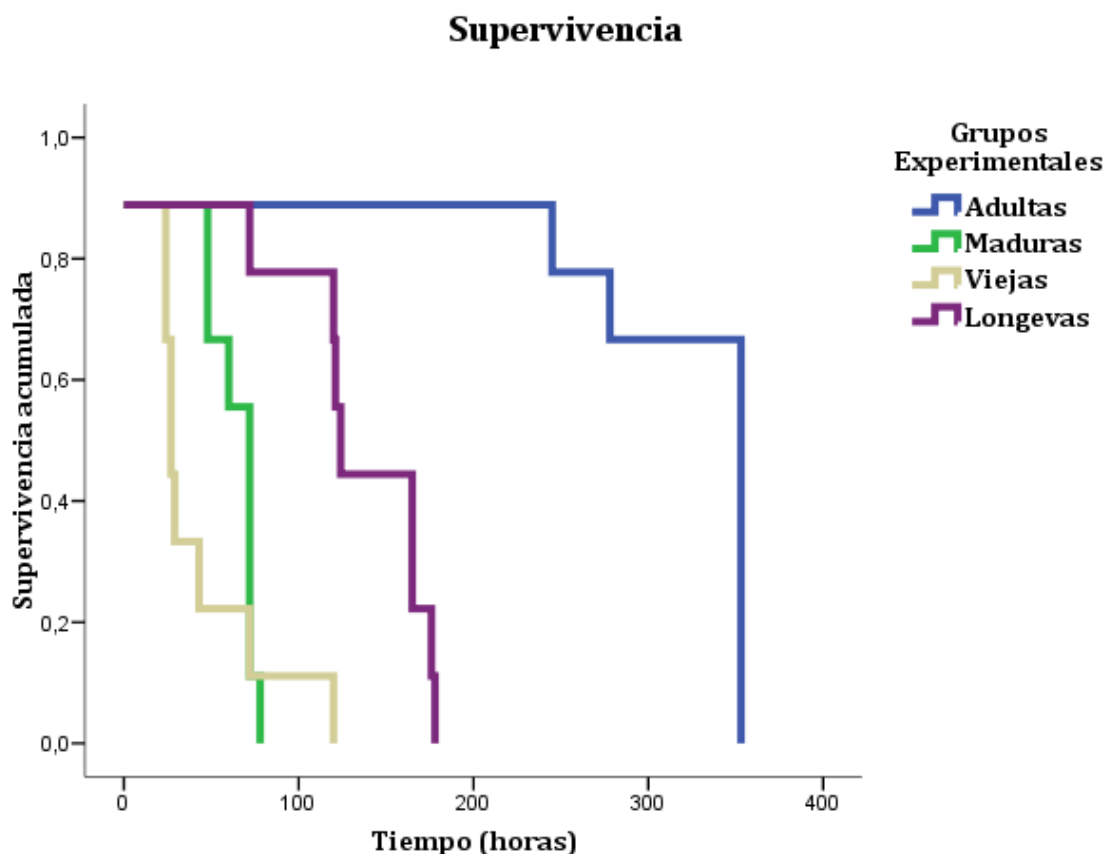
Tiempo	Tratamiento	ASE	Grupos experimentales			
			Edad (meses)			
			Adultas	Maduras	Viejas	Longevas
			9	13	21	>30
0 horas	PBS	Basal	4,45±0,34	6,06±0,25	11,70±0,22•••	2,94±0,24
		Estimulado	6,71±0,35	6,59±0,09	12,92±0,50•••	6,45±0,52
	LPS	Basal	4,65±0,36	6,78±0,83	12,01±0,23•••	4,22±0,44
		Estimulado	6,74±0,35	6,46±0,13	13,01±0,50••	6,53±0,32
2 horas	PBS	Basal	5,65±0,29	13,99±0,92•••**	10,91±0,29•••	4,66±0,18*
		Estimulado	13,57±0,45***	21,36±0,74•••***	23,20±0,75•••***	13,17±0,30***
	LPS	Basal	13,57±0,45***c	13,99±0,92***	11,91±0,09•	7,96±0,28•••**a
		Estimulado	12,67±0,46***	33,81±0,41•••***	31,64±1,66•••***a	15,04±0,45***
24 horas	PBS	Basal	6,54±0,23*	12,43±0,49•••**	8,62±0,47**	6,31±0,35**#
		Estimulado	11,85±0,36***	14,96±0,83###	20,31±0,35•••***c	10,99±0,45**#
	LPS	Basal	11,85±0,38**c	12,56±0,87***	7,62±0,47•**#	12,99±0,65***##c
		Estimulado	12,92±0,42***	24,75±0,90•••***##c	36,35±0,88•••***#	14,46±0,62***

Se muestra la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. • $P$ <0,05, •• $P$ <0,01, ••• $P$ <0,001 con respecto al valor del grupo de edad adulta. \* $P$ <0,05, \*\* $P$ <0,01, \*\*\* $P$ <0,001 con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P$ <0,05, ## $P$ <0,01, ### $P$ <0,001 con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a $P$ <0,05, b $P$ <0,01, c $P$ <0,001 con respecto a su correspondiente grupo control (con PBS). ASE: Anión superóxido extracelular.

## Supervivencia

En la figura 31 se representan los resultados obtenidos en la supervivencia de los animales, tras la administración de la dosis de 50 mg/kg de LPS, en los diferentes grupos experimentales de adultas, maduras, viejas y longevas. Se aprecia una letalidad de la dosis con un 75% de mortalidad de los animales que la

recibieron, si bien el grupo de edad adulta, no manifestaron bajas en el número de animales, tras la endotoxemia.



**Figura 31.** Curvas de supervivencia en horas tras la inducción de un shock endotóxico (50mg/kg) en ratonas ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas. Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental.

La tasa de supervivencia mínima y máxima para la edad madura fue de 42 y 74 horas, respectivamente, con una supervivencia media de 58 horas. Para el grupo de viejas fue de 17 y 63 horas, con una media de 41 horas, y por último, el grupo de edad longeva fue de 90 y 163 horas, con una media de 129 horas. El análisis estadístico con el test de *Kaplan-Meier* reveló una diferencia significativa global entre grupos (Log Rank [Mantel-Cox]= 0,00145).

**4.1. B. Efecto de la administración de LPS en ratonas adultas (100mg/kg) y en viejas (25 mg/kg).**

A continuación se exponen en tablas 16 y 17, los resultados correspondientes a los parámetros de funciones inmunitarias y de estado redox, analizados en los leucocitos peritoneales de ratones hembras adultas ( $36 \pm 2$  semanas de edad) y viejas ( $84 \pm 2$  semanas de edad) sometidas a un shock endotóxico con unas dosis de 100 y 24 mg/kg de LPS, respectivamente. Los datos se han recogido antes de la administración del LPS (0 horas) y a las 2 y 24 horas de la administración. En las ratonas adultas (tabla 16), la quimiotaxis en macrófagos y linfocitos disminuyó tras la administración del LPS, con diferencias estadísticamente significativas a la 24 horas en macrófagos ( $p < 0,01$ ) y a las 2 y 24 horas en linfocitos ( $p < 0,001$ ). La movilidad espontánea siguen la misma respuesta en los linfocitos, pero en los macrófagos aumentó a las 24 horas ( $p < 0,05$ ). El índice fagocítico de los macrófagos disminuyó a las 2 y 24 horas de la administración del LPS. También los niveles de anión superóxido intracelular disminuyó a las 2 y 24 horas ( $p < 0,05$ ), tanto en el estado basal como estimulado. En lo que respecta a la proliferación de linfocitos, se produjo un aumento de la respuesta, tras la administración de la endotoxina, tanto en la basal como en respuesta a Con A y LPS. En relación a los antioxidantes analizados, se dió una mayor actividad de la CAT a las 24 horas de inicio del shock endotóxico. El anión superóxido extracelular aumentó ( $p < 0,01$ ), a las 2 horas de inyección del LPS, tanto en situación basal como estimulada.

En los animales viejos (tabla 17) la quimiotaxis aumentó en macrófagos a las 2 horas de administrar el LPS y disminuyó ( $p < 0,001$ ) a las 24 horas, tanto en

linfocitos como en macrófagos. En lo que respecta a la movilidad espontánea, aumentó en macrófagos a las 2 y 24 horas y disminuyó a las 24 horas en linfocitos. La fagocitosis disminuyó a las 2 y 24 horas, tanto en el I.F como en la E.F.

**Tabla 16.** Cambios en parámetros de función inmunitaria y estado redox de leucocitos peritoneales de ratonas ICR-CD1 adultas, en situación previas a las 0 horas, y a las 2 y 24 horas, después de la inyección con 100 mg/kg de LPS.

Parámetros		Tiempo		
Función inmunitaria	Unidades	0 horas	2 horas	24 horas
Quimiotaxis de macrófagos	I.Q	484±22	450±22	284±24**###
Movilidad espontánea de macrófagos	M.E	243±22	262±23	309±30*
Fagocitosis de Macrófagos				
Índice fagocítico	I.F	473±26	377±31*	358±23**
Eficacia fagocítica	E.F	70±2	68±5	74±5
Niveles de anión superóxido intracelular	nmoles/10 <sup>6</sup> cél			
Basal		14,7±0,4	11,0±0,6*	10,8±0,5*
Estimulado		14,3±0,3	11,6±0,2*	10,3±0,3*
Quimiotaxis de linfocitos	I.Q	723±24	506±13***	446±15***
Movilidad espontánea de linfocitos	M.E	632±26	273±20***	275±28***
Basal	cpm	1525±97	3094±231**	1824±387#
Linfoproliferación Con A	cpm	2381±276	5353±278***	2443±430###
LPS	cpm	5335±143	10638±315***	4293±532###
Actividad natural killer (NK)	%	57±4	47±4	53±6
Estado redox				
Antioxidantes				
Catalasa (CAT)	U cat/10 <sup>6</sup> cél	44±4	36±3	53±2**###
Glutatión total (GSH)	nmoles/10 <sup>6</sup> cél	2,08±0,01	2,14±0,02	2,16±0,03
Oxidantes				
Anión superóxido extracelular	nmoles/10 <sup>6</sup> cél			
Basal		9,32±0,21	13,47±0,32**	10,43±0,21##
Estimulado		11,32±0,26	15,67±0,56**	11,09±0,76##

Cada valor representa la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas.

Los niveles de anión superóxido intracelular disminuyeron a las 2 y 24 horas y tanto la basal como en respuesta a los mitógenos. Los antioxidantes analizados mostraron aumento a las 2 horas de administración del LPS en el caso

del GSH, pero una disminución a las 2 y 24 horas en la CAT. El anión superóxido extracelular aumentó ( $p<0,01$ ) a las 24 horas, tanto el basal como el estimulado.

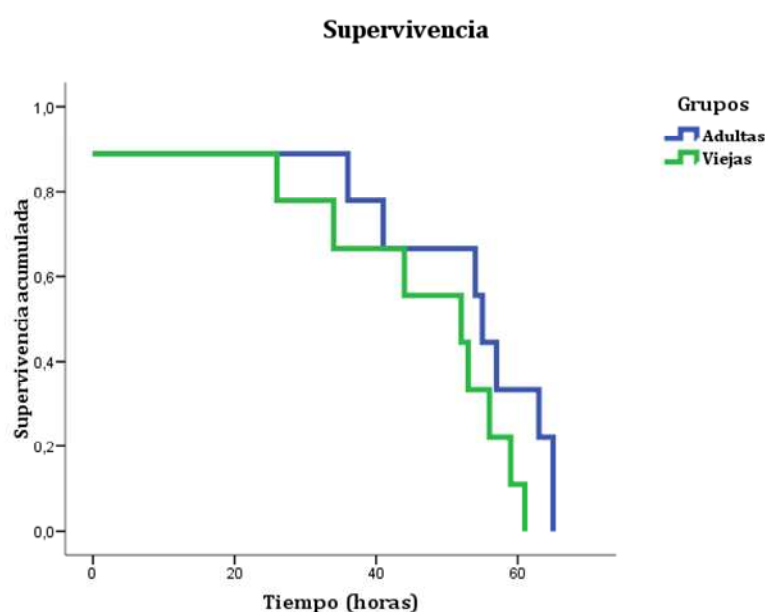
**Tabla 17.** Cambios en parámetros de función inmunitaria y estado redox de leucocitos peritoneales de ratonas ICR-CD1 viejas, en situación previa a las 0 horas, y a las 2 y 24 horas, después de la inyección con 25 mg/kg de LPS.

Parámetros		Tiempo		
Función inmunitaria	Unidades	0 horas	2 horas	24 horas
Quimiotaxis de macrófagos	I.Q	386±12	471±18**	220±17***###
Movilidad espontánea de macrófagos	M.E	223±13	312±15**	275±16*
Fagocitosis de macrófagos				
Índice fagocítico	I.F	339±18b	254±23*b	328±21*
Eficacia fagocítica	E.F	71±2	47±2***c	49±2***c
Capacidad digestiva celular	nmoles/10 <sup>6</sup> cél			
Basal		14,3±0,2	11,5±0,2**	10,2±0,5**
Estimulado		12,6±0,4a	13,4±0,4a	10,1±0,4*##
Quimiotaxis de linfocitos	I.Q	442±21c	455±20	248±8***###c
Movilidad espontánea de linfocitos	M.E	358±10c	375±19b	252±9***###c
Basal	cpm	1373±68	2587±93***	2638±99***a
Linfoproliferación Con A	cpm	3659±94c	5720±182***	2521±200***###
LPS	cpm	4622±67b	9787±700***	3801±158*###
Actividad natural killer (NK)	%	31±1b	34±1a	28±1c
Estado redox				
Antioxidantes				
Catalasa (CAT)	U cat/10 <sup>6</sup> cél	122±4c	50±2***b	32±2***###c
Glutatión total (GSH)	nmoles/10 <sup>6</sup> cél	0,60±0,07c	1,50±0,09***c	0,64±0,06###c
Oxidante				
Anión superóxido extracelular	nmoles/10 <sup>6</sup> cél			
Basal		11,3±0,2b	11,1±0,5b	14,3±1,0***##b
Estimulado		12,5±1,1a	11,8±1,8c	15,4±0,8***##b

Cada valor representa la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P<0,01$ , ### $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a los adultos (tabla 17).

En la figura 32 se representa la supervivencia de los ratones adultos y viejos, tras administración de la dosis de LPS (100 y 25 mg/kg, respectivamente).

El grupo de adultas tuvo una supervivencia mínima y máxima de 35 y 62 horas, respectivamente, con una supervivencia media de  $48 \pm 4$  horas. La supervivencia mínima y máxima de las viejas fue de 30 y 60 horas respectivamente, con una media de  $42 \pm 7$  horas. El test de *Kaplan-Meier* no revela diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Log Rank [Mantel-Cox]= 0,157).



**Figura 32.** Curvas de supervivencia en horas tras la inducción de un shock endotóxico en ratonas ICR-CD1 adultas (con la dosis de 100mg/kg de LPS) y viejas (con la dosis de 25 mg/kg de LPS). Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental.

#### **4.2. Comparación de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 de edad madura, que sobrevivieron o murieron tras la administración de 50 mg/kg de LPS.**

Al comprobar que en la edad madura había una respuesta heterogénea a la dosis de 50 mg/kg, en lo que respecta a la supervivencia de los ratones, se llevo a cabo otro estudio con mayor número de animales, para poder comparar los cambios de los parámetros de función y estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de ratonas ICR-CD1 maduras que sobrevivieron o morían tras la administración de esa cantidad de endotoxina. Al igual que en primer apartado los resultados se indican con el siguiente orden:

- En primer lugar, los *parámetros de función* que se analizan directamente en macrófagos, como la capacidad de movilidad espontánea y quimiotaxis, así como la fagocitosis y los niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo cuales corresponden a macrófagos. Seguidamente, se mostrarán las funciones correspondientes a linfocitos: quimiotaxis y la capacidad de linfoproliferación. Por último la actividad NK de los leucocitos peritoneales.
- En segundo lugar, se muestran los parámetros de *estrés oxidativo*, primero los antioxidantes (niveles de GSH y la actividad de CAT) y posteriormente los oxidantes, concretamente el anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ).

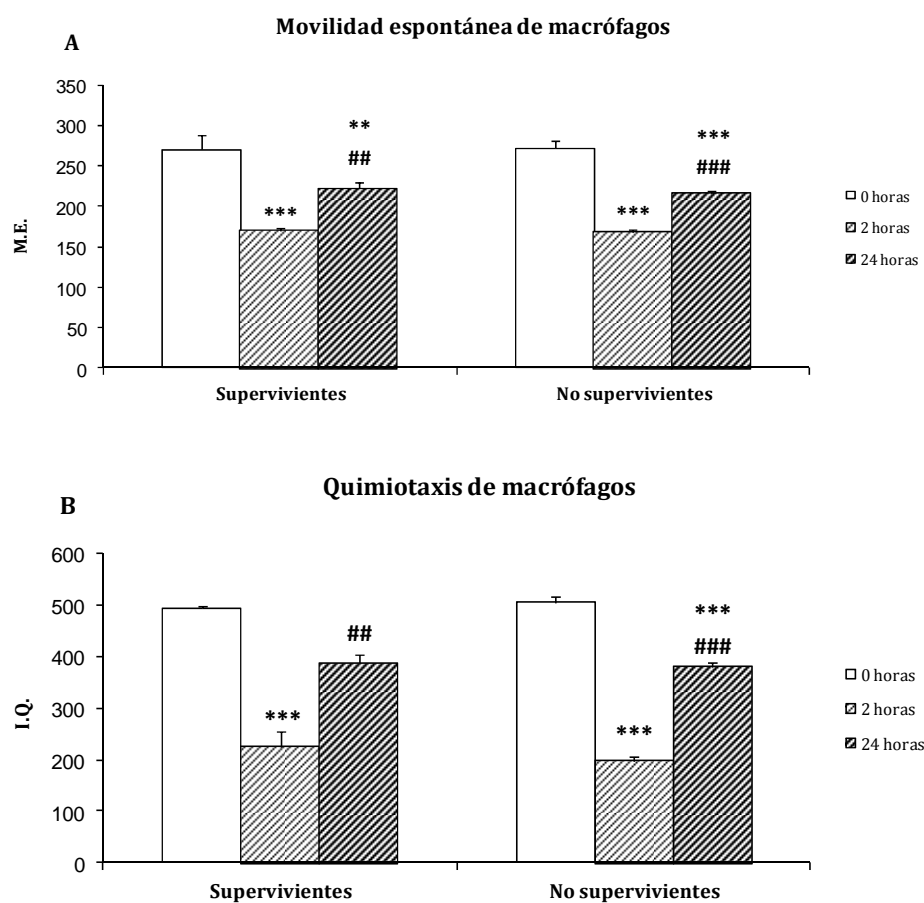
En todos los casos se indican los datos obtenidos antes de la administración del LPS (0 horas), tiempo que se toma de referencia para comparar los resultados a las 2 y 24 horas tras la inyección de la endotoxina. Se mostrarán



las diferencias estadísticas entre los valores en los ratones que sobrevivieron y mueren.

### Función de los macrófagos

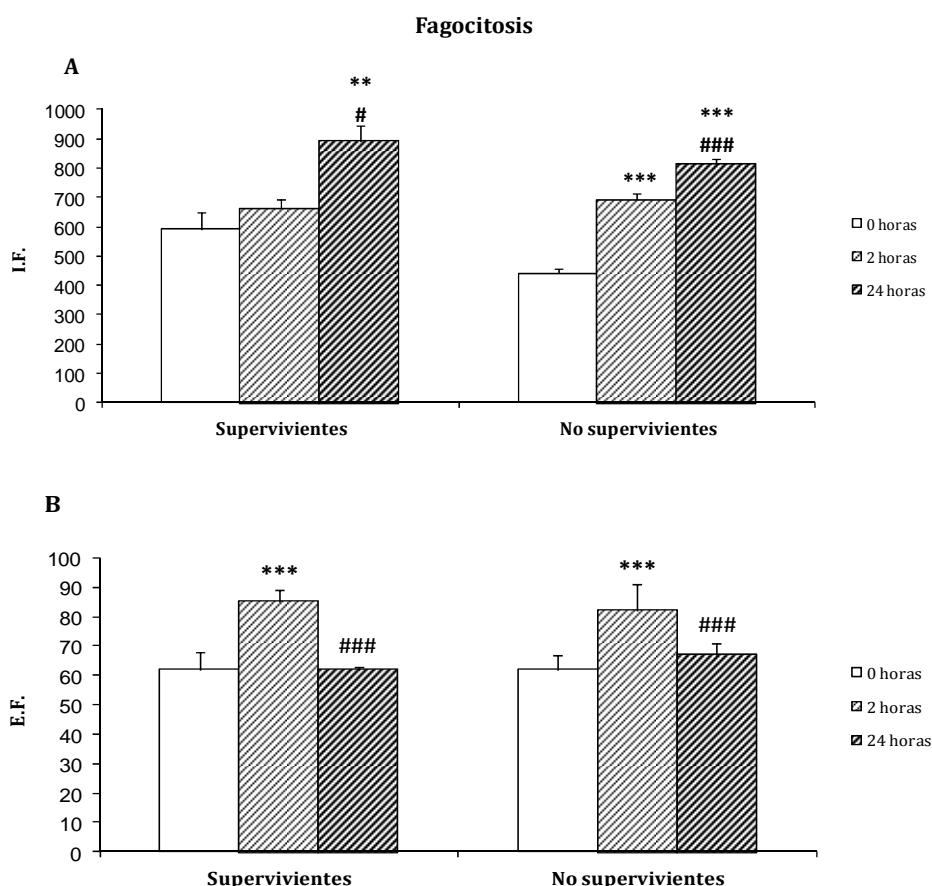
Los resultados relativos a las funciones de macrófagos estudiadas, se muestran en las figuras 33, 34 y 35 y en la tabla 18.



**Figura 33. Movilidad espontánea (M.E) (A) e Índice de quimiotaxis (I.Q) (B) de macrófagos peritoneales (número de macrófagos por filtro) de ratonas ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor de las 0 horas. ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  con respecto a las 2 horas.

En lo que respecta a la movilidad espontánea (figura 33), tanto en los animales supervivientes como en los no supervivientes, tuvo lugar una

disminución significativa a las 2 y 24 horas ( $P<0,001$ ), aunque se apreció una disminución a las 24 horas encontramos un aumento de la quimiotaxis en comparación con las 2 horas. En la quimiotaxis, se observaron resultados similares, pero en este caso la disminución a las 24 horas en las supervivientes no fue significativa.

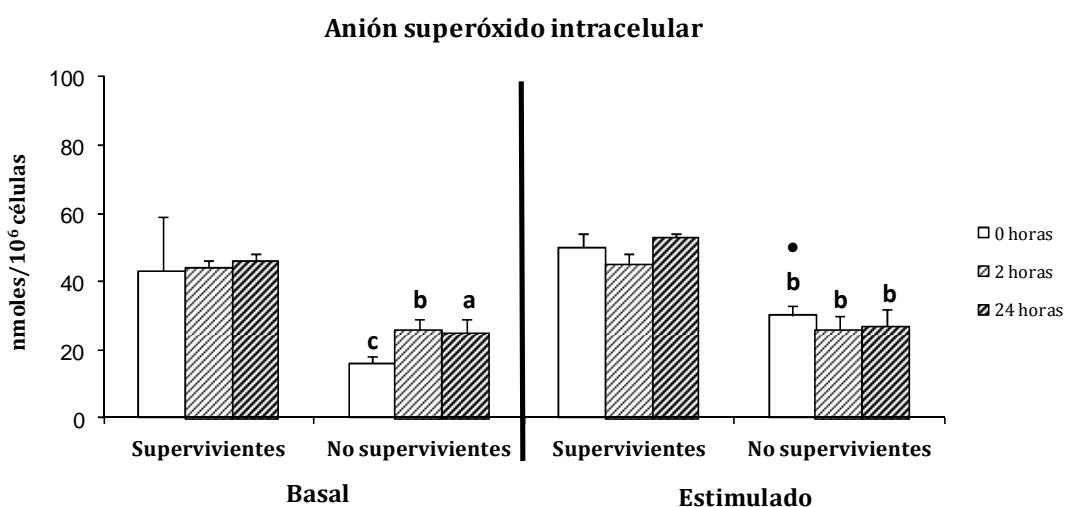


**Figura 34.** Índice de fagocitosis (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos) (A) y eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos) (B), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al valor de la 0 horas. # $P<0,05$ , ### $P<0,001$  con respecto a las 2 horas.

El índice de fagocitosis (figura 34 A) mostró un aumento progresivo, tras la administración del LPS, hecho que fue más significativo en los no supervivientes (a

las 2 y 24 horas ( $P<0,001$ ) en comparación con el tiempo 0 horas). En cuanto a la eficacia de fagocitosis, se manifestó para ambos grupos un aumento a las 2 horas ( $P<0,001$ ) en comparación con el tiempo 0 horas.

En lo que respecta a los niveles de anión superóxido intracelular (figura 35), no se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 2 y 24 horas en comparación con el tiempo 0 hora, en ninguno de los grupos. No obstante, los niveles de este anión indicador de la capacidad digestiva celular fueron mayores en el grupo experimental superviviente, tanto en el estado basal (a las 0 horas [ $P<0,001$ ], 2 horas [ $P<0,01$ ], y 24 horas [ $P<0,05$ ]), como en el estimulado (0 horas [ $P<0,01$ ], 2 horas [ $P<0,01$ ], y 24 horas [ $P<0,01$ ]) que en el no superviviente.



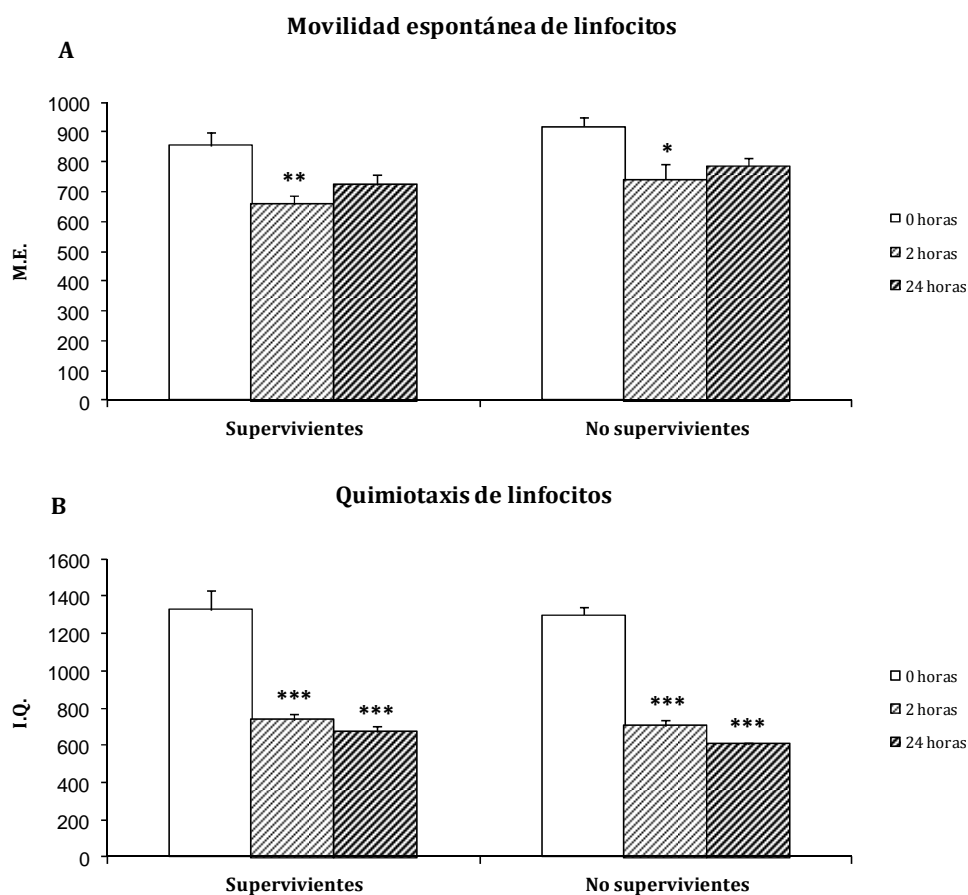
**Figura 35. Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y bajo la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. •  $P<0,05$ , con respecto al correspondiente valor basal. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con relación al correspondiente valor al grupo de maduras (supervivientes).

**Función de los linfocitos**

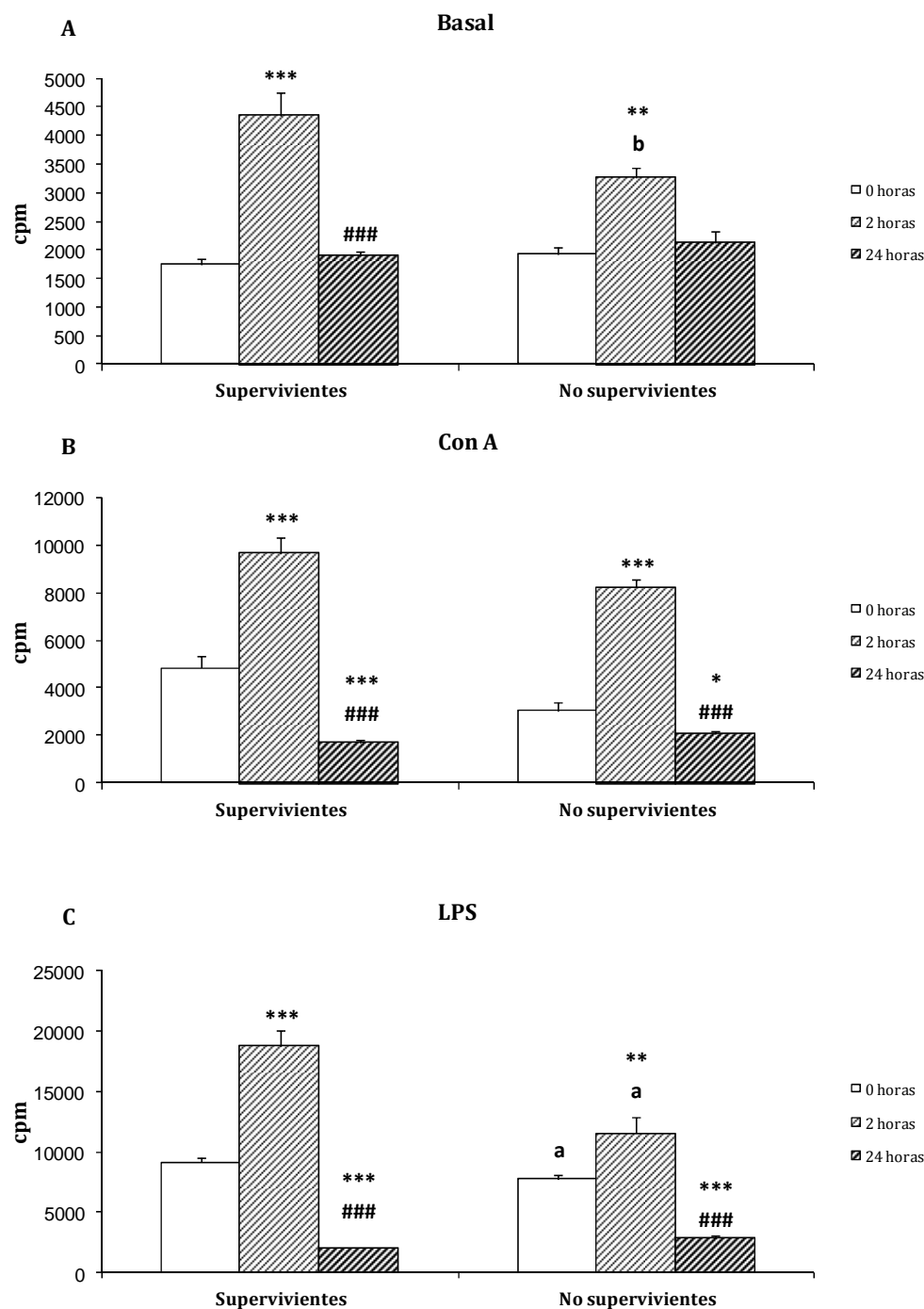
Los resultados de las funciones estudiadas en linfocitos se muestran en las figuras 36, 37 y 38 y en la tabla 18. En la movilidad espontánea (Fig. 36 A), tuvo lugar una disminución sólo a las 2 horas tanto en el grupo de supervivientes ( $p<0,01$ ) como en el de no supervivientes ( $p<0,05$ ), con respecto al tiempo 0 horas. En los índices quimiotaxis (Fig. 36 B), se observó en ambos grupos supervivientes y no supervivientes, una disminución muy significativa ( $p<0,001$ ) a las 2 y 24 horas, tras la inyección de la endotoxina, con respecto al tiempo 0 horas. No se apreciaron cambios entre los grupos que se comparaban, supervivientes y no supervivientes en los valores obtenidos para estas funciones.

En lo que respecta a la linfoproliferación, la basal y en presencia de los mitógenos ConA y LPS (Fig. 37 A, B y C, respectivamente), cabe destacar un incremento a las 2 horas, en todos los grupos experimentales, en comparación con el tiempo 0 h, y una disminución a las 24 horas en relación al tiempo 0 h en presencia de ConA y LPS.

Comparando los valores obtenidos en los no supervivientes en relación con las que sobrevivieron, se aprecia unas menores cpm a las 2 horas en la proliferación espontánea o basal y en respuesta al LPS. También los valores a tiempo 0 h, fueron menores en respuesta a ConA y LPS.



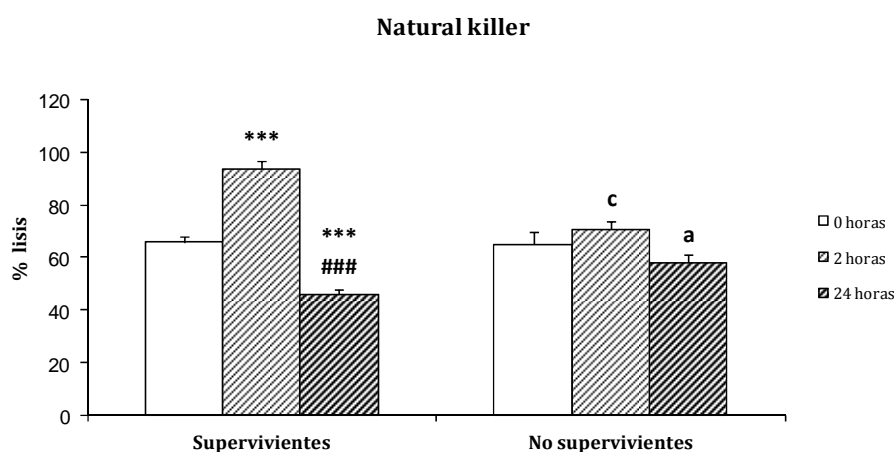
**Figura 36. Movilidad espontánea (M.E) (A) e índice de quimiotaxis (I.Q) (B) de linfocitos peritoneales (número de linfocitos por filtro) de ratonas ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al valor de la 0 horas.



**Figura 37. Linfoproliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal) (A), y estimulados con concanavalina A (Con A) (B) y lipopolisacárido (LPS) (C), procedentes de ratones ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor de las 0 horas. # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con relación al correspondiente valor al grupo de maduras (supervivientes).

### Actividad natural killer (NK) de leucocitos peritoneales.

La actividad natural killer (NK) (Fig. 38), presentó un comportamiento diferente en los animales supervivientes y no supervivientes. En los primeros, tuvo lugar un incremento muy significativo a las 2 horas ( $P<0,001$ ), mientras que a las 24 horas se observó una disminución ( $P<0,001$ ), con relación a las 0 y 2 horas. En el grupo de no supervivientes se dieron cambios, tras la administración del LPS, así los valores de NK de estos animales, fueron significativamente menores a las 2 y 24 horas ( $P<0,001$  y  $P<0,05$ , respectivamente), tras el shock endotóxico, en relación con los valores observados en los animales supervivientes.



**Figura 38. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de leucocitos peritoneales, procedentes de ratones ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de las 0 horas. ###  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P<0,05$ , c  $P<0,001$  con relación al correspondiente valor al grupo de maduras (no supervivientes).

**Tabla 18.** Parámetros de función inmunitaria de leucocitos peritoneales de ratonas ICR-CD1 maduras, en situación previa a las 0 horas, y a las 2 y 24 horas, tras la inyección de 50 mg/kg de LPS, en animales no supervivientes (parte superior) y supervivientes (parte inferior) a dicha administración de la endotoxina.

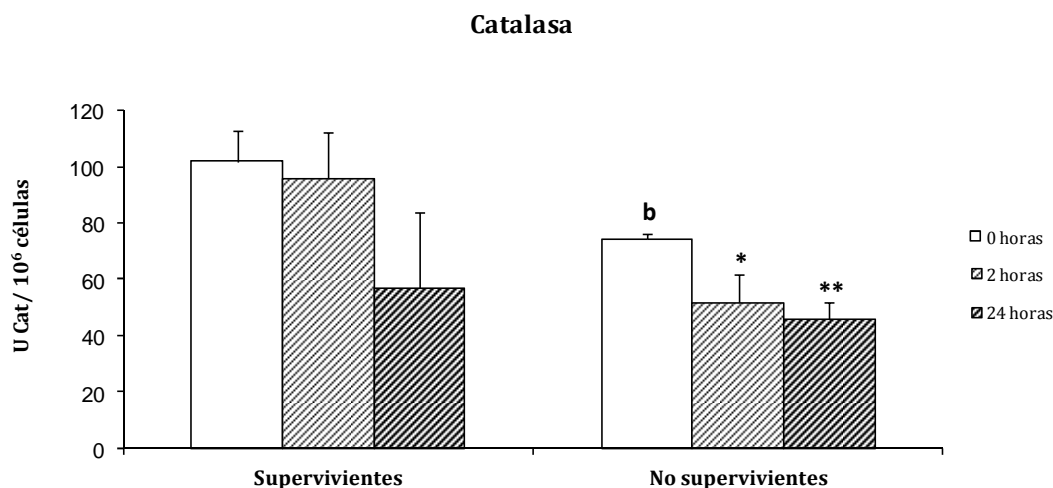
Parámetros		Unidades	Tiempo			
Función inmunitaria			0 horas	2 horas	24 horas	
No Supervivientes		nmoles/10 <sup>6</sup> cél				
Macrófagos						
Quimiotaxis			I.Q	505±10	198±9***	379±9***###b
Movilidad espontánea			M.E	272±9	168±4***	216±4***##
Fagocitosis    Índice fagocítico			I.F	442±15	692±22***	814±69***###
Eficacia fagocítica			E.F	62±2	82±3***	67±1###
Capacidad digestiva celular						
Basal				16±2c	26±3b	25±4a
Estimulado				30±3a	26±4b	27±5b
Linfocitos						
Quimiotaxis			I.Q	1300±41	707±31***	607±8***
Movilidad espontánea			M.E	918±34	741±50*	786±26
Basal		cpm	1928±117	3268±163*	2120±196	
Linfoproliferación	Con A	cpm	3056±357	8230±325***	2087±110*###	
	LPS	cpm	7764±321a	11547±1379**b	2859±141***####a	
Actividad natural killer (NK)		%	65±5	71±3c	58±3a	
Supervivientes		nmoles/10 <sup>6</sup> cél				
Macrófagos						
Quimiotaxis			I.Q	493±5	224±31***	387±16##
Movilidad espontánea			M.E	270±19	170±4***	222±7*#
Fagocitosis    Índice fagocítico			I.F	591±57	664±32	893±51**
Eficacia fagocítica			E.F	62±3	85±2***	62±1###
Capacidad digestiva celular						
Basal				43±16	44±2	46±2
Estimulado				50±4	45±3	53±1
Linfocitos						
Quimiotaxis			I.Q	1330±99	736±32**	672±33***
Movilidad espontánea			M.E	854±44	659±30*	724±34
Basal		cpm	1750±88	4357±399***	1892±66###	
Linfoproliferación	Con A	cpm	4824±481	9667±656***	1706±107**###	
	LPS	cpm	9139±713	18780±1307***	2042±20***###	
Actividad natural killer (NK)		%	66±2	94±3***	46±2***###	

Cada dato representa la media ± error estándar de 12 ratones (no supervivientes) y 3 (supervivientes), realizado cada parámetro por duplicado y correspondiente a su mismo número de animales. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,001$ , c  $P < 0,001$  al correspondiente valor en los ratones maduros (supervivientes).



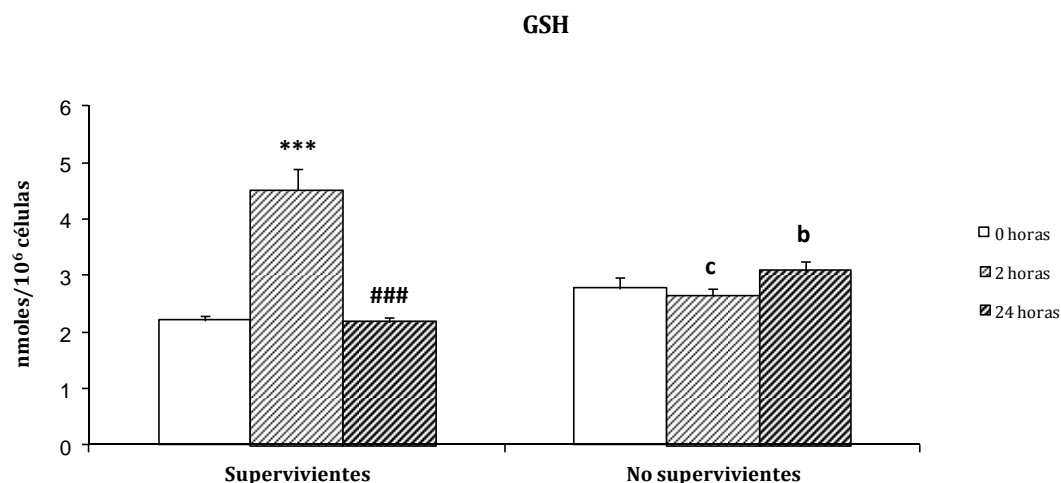
### Defensas antioxidantes y compuesto oxidante

A continuación se presentan los resultados referentes a los niveles de las defensas antioxidantes (actividad de catalasa y contenido de GSH) y los niveles del compuesto oxidante anión superóxido extracelular (figuras 39, 40 y 41, respectivamente y tabla 19).

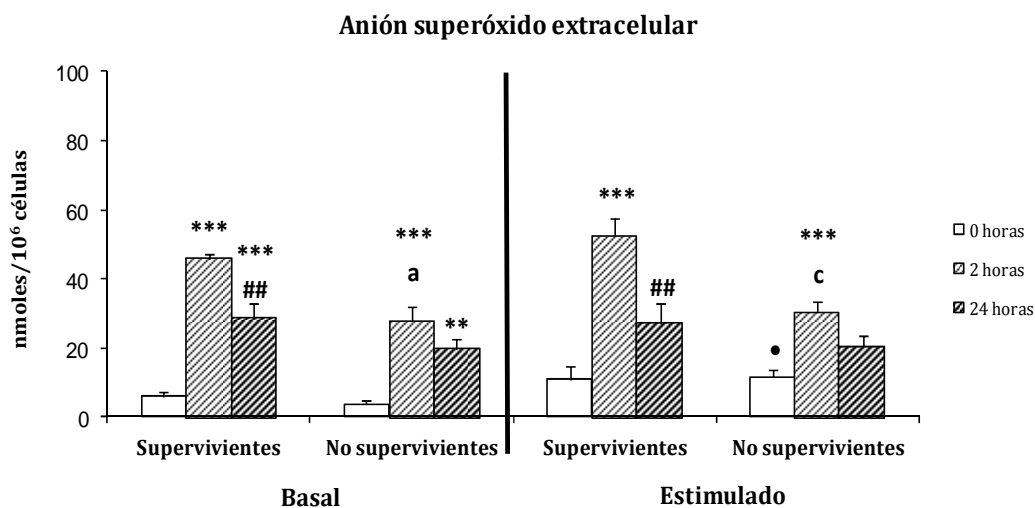


**Figura 39. Actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) (Ucat/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. <sup>b</sup>  $P < 0,01$  con relación al correspondiente valor al grupo de maduras (supervivientes).

La actividad catalasa (figura 39) disminuyó en el grupo de ratones no supervivientes a las 2 y 24 horas ( $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente) en comparación con el tiempo 0 horas. Estas disminuciones significativas no tuvo lugar en el grupo de supervivientes que, además, unos valores de actividad de la enzima significativas superiores ( $p < 0,01$ ) a tiempo 0 horas.



**Figura 40. Niveles de glutatión reducido (GSH) (nmoles/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P$ <0,001 con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ### $P$ <0,001 con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. b  $P$ <0,01, c  $P$ <0,001 con relación al correspondiente valor al grupo de maduras (supervivientes).



**Figura 41. Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/10<sup>6</sup> cels) basal y bajo la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 maduras, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 (supervivientes) y 12 (no supervivientes) valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P$ <0,01, \*\*\* $P$ <0,001 con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P$ <0,01 con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P$ <0,05, con respecto al correspondiente valor basal. a  $P$ <0,05, b  $P$ <0,001 con relación al correspondiente valor al grupo de maduras (supervivientes).

En lo referente al contenido de GSH (figura 40), se observó en el grupo de supervivientes un aumento muy significativo a las 2 horas ( $P<0,001$ ), tras la inyección de la endotoxina, y seguidamente una disminución a las 24 horas, alcanzándose los niveles del tiempo 0 horas. Por el contrario, los animales no supervivientes no mostraron, diferencias significativas a lo largo de las horas valoradas, tras la endotoxemia.

**Tabla 19.** Parámetros de estado redox de leucocitos peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 maduras, a las 0, 2 y 24 horas, tras la inyección de 50 mg/kg de LPS, en animales no supervivientes (parte superior) y supervivientes (parte inferior) a dicha administración de la endotoxina.

Parámetros Estado redox	Unidades	0 horas	Tiempo 2 horas	24 horas
<b>No supervivientes</b>				
<b>Antioxidantes</b>				
Catalasa (CAT)	U cat/ $10^6$ cél	74±2	52±10a	46±6
Glutación total (GSH)	nmoles/ $10^6$ cél	2,78±0,19	2,65±0,41c	3,09±0,16b
<b>Oxidantes</b>				
Anión superóxido extracelular	nmoles/ $10^6$ cél			
Basal		3,6±1,2b	27,8±4,1***a	19,7±2,9***
Estimulado		11,5±2,3	30,2±3,4***c	20,5±3,2**
<b>Supervivientes</b>				
<b>Antioxidantes</b>				
Catalasa (CAT)	U cat/ $10^6$ cél	102±11b	96±16	57±27*
Glutación total (GSH)	nmoles/ $10^6$ cél	2,21±0,07	4,51±0,37***	2,19±0,06###
<b>Oxidantes</b>				
Anión superóxido extracelular	nmoles/ $10^6$ cél			
Basal		5,9±4,0	45,8±1,1***	29,0±3,9***##
Estimulado		10,8±4,0	52,59±4,9***	27,1±5,7##

Cada dato representa la media ± error estándar de 12 ratones (no supervivientes) y 3 (supervivientes), realizado cada parámetro por duplicado y correspondiente a su mismo número de animales. \*\*\* $P<0,001$ , \*\*  $P<0,01$ , \*  $P<0,05$  con respecto al valor de la 0 horas. ### $P<0,001$ , ## $P<0,01$ , # $P<0,05$  con respecto al valor de la 2 horas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,001$ , c  $P<0,001$  al correspondiente valor en los ratones maduros (supervivientes).

Comparando los valores en no supervivientes con los correspondiente en supervivientes, se observa que los valores de los GSH fueron menores ( $p<0,001$ ), a

las 2 horas de la administración de la endotoxina. A las 24 horas, sin embargo a las 24 horas fueron mayores ( $p<0,01$ ) en los no supervivientes.

Los resultados referentes al anión superóxido extracelular (figura 41), mostraron un aumento significativo a las 2 y 24 horas, en las muestras no estimuladas (condición basal), mientras que en las estimulada se exhibió únicamente ese aumento a las 2 horas, tras el shock endotóxico. Este comportamiento fue similar en los supervivientes y no supervivientes, con la diferencia significativa de presentar unos niveles menores a las 2 horas en los no supervivientes.

### **Supervivencia**

El análisis de supervivencia mostró que los animales no supervivientes, tuvieron una media de muerte de 62 horas, con un límite inferior de 35 horas y un límite superior de 73 horas. Donde el estadístico de prueba Log Rank (Mantel-cox), arrojó una diferencia estadística de  $P<0,001$ , con respecto al grupo superviviente.

**4.3. El efecto de una estrategia de *Hormesis* basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones ICR-CD1 hembras, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro. Esto se analizará tanto en animales controles como sometidas a un shock endotóxico letal, por LPS de *E. coli*, en la vejez.**

A continuación se exponen, los resultados correspondientes al efecto de la administración de bajas dosis (0,1 mg/kg) de lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) como “*hormetina*” durante la edad madura (55±2 semanas) en ratonas ICR-CD1 vírgenes, en diversos parámetros funcionales y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales, así como la evaluación de una serie de pruebas conductuales sensoriomotoras, exploratorias y de ansiedad a la edad de 84±2 semanas (viejas). En un segundo apartado, se valoró el efecto del tratamiento hormético en ratonas maduras ICR-CD1 vírgenes de 55±2 semanas de edad con envejecimiento prematuro, en algunos parámetros funcionales y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales, y a la edad de 84±2 semanas de edad fueron evaluadas mediante pruebas conductuales (sensoriomotoras, capacidad exploratoria y ansiedad) y se procedió a la valoración de parámetros de función y estrés oxidativo, tras provocación de un shock endotóxico mediante inyección intraperitoneal de 50 mg/kg (i.p) de lipopolisacarido de *E. coli*.

Los resultados se indican en las figuras de la 42 a la 63 y en las tablas de la 20 a la 25, y se han agrupado en un primer lugar, las pruebas conductuales sensoriomotoras, capacidad exploratoria y ansiedad, y en segundo lugar, los

parámetros de funcionalidad y estrés oxidativo analizados en leucocitos peritoneales.

En la representación gráfica de los resultados se muestran en un primer lugar, la diferencias estadísticas correspondientes al grupo que recibió la hormetina con respecto a sus respectivos grupos controles (adultas y viejas control), seguidamente, se muestran las diferencias estadísticas entre los grupos PAM y NPAM tanto control como horméticas, y con respecto a las 0 horas (referencia del estado basal de los leucocitos peritoneales) de los valores obtenidos a las 2 y 24 horas tras el shock endotóxico.

#### ***4.3.A. Efecto del tratamiento hormético en ratonas cronológicamente maduras***

##### **4.3.1. Efecto de la hormesis sobre la conducta**

En base a la experiencia previa de grupos de investigación expertos en el análisis de los parámetros conductuales en animales (Giménez-Llort y colaboradores), se llevaron a cabo diversas pruebas de conducta, abordándose así, una amplia batería de parámetros constituidos en la evaluación sensoriomotora, capacidad exploratoria y de conductas de ansiedad, y cuyos resultados se muestran en la figuras (42 y 43) y tablas (20 y 21).

##### **Análisis del peso corporal de los ratones**

Para iniciar la batería de pruebas de comportamiento se tomó en cuenta el peso en gramos de cada uno de los grupos incluidos en el estudio, puesto que las posibles diferencias entre los grupos, condicionaría la capacidad de los animales de llevar a cabo algunas de la pruebas de conducta con éxito (capacidad de equilibrio, coordinación motora y vigor muscular).

De este modo, el análisis de los pesos no mostró diferencias significativas entre las adultas-maduras ( $50,21 \pm 1,85$ ), viejas control ( $46,24 \pm 2,32$ ) y viejas con hormesis ( $41,77 \pm 2,12$ ).

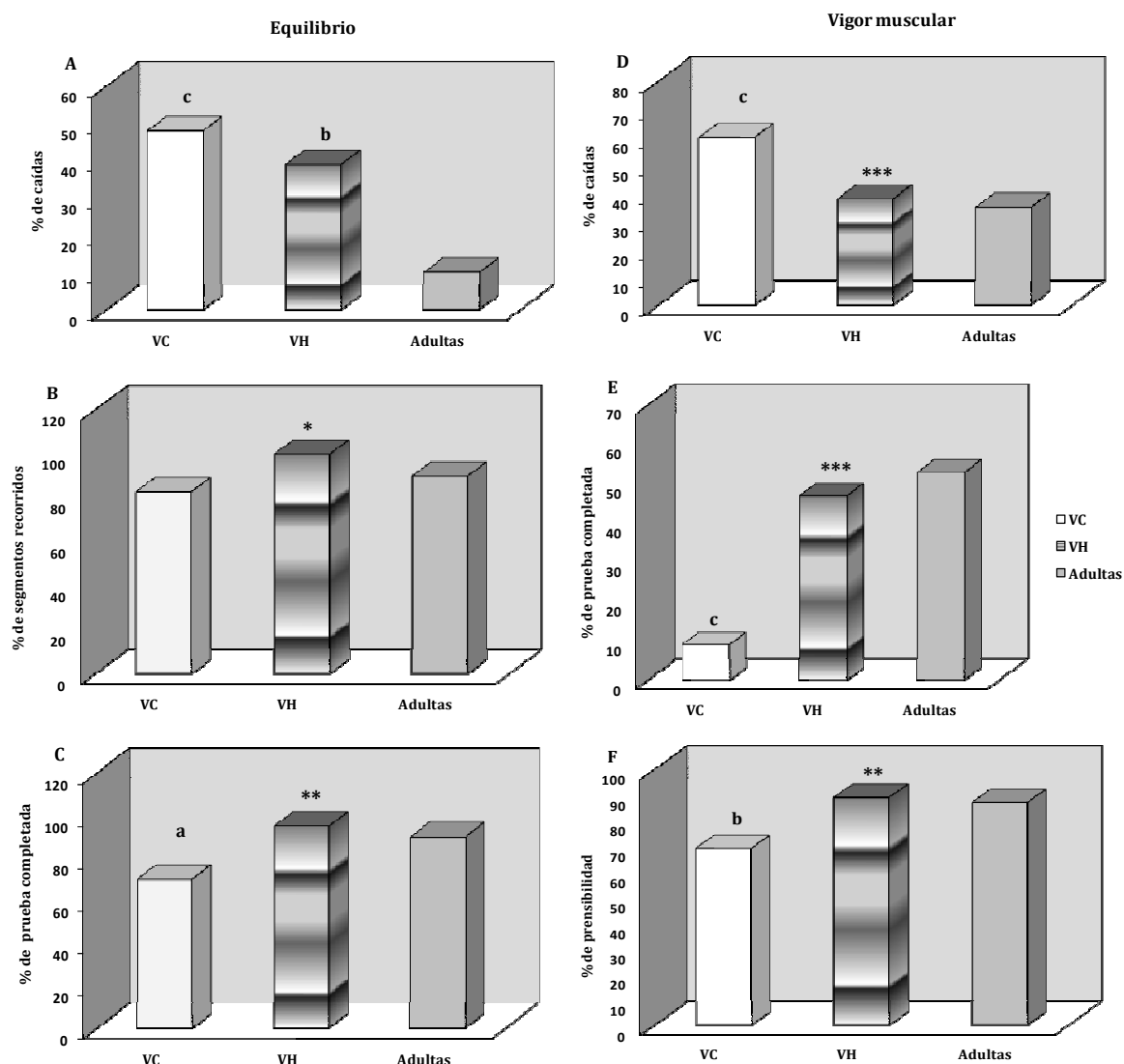
### **Estudio de parámetros comportamentales**

#### ***Capacidad sensoriomotoras***

Las distintas pruebas que se agrupan en esta sección evalúan los reflejos, el equilibrio, la coordinación motora, el vigor muscular y el tipo de prensilidad empleado por los animales incluidos en el estudio (tabla 20). Todas ellas se realizaron durante el primer día de experimento.

El primer resultado obtenido no mostró diferencias entre los grupos estudiados (adultas-maduras, viejas control y viejas con hormesis) en la capacidad de exhibir reflejos, tales como el reflejo visual (valorado como la capacidad de extender las patas delanteras en el momento en que el ratón, suspendido en el aire por la cola, se aproxima lo suficiente a una superficie de color negro) o el reflejo de extensión de las patas posteriores (reflejo que exhiben estos animales de forma natural en el momento en que se les suspende en el aire cogidos por la cola, y que es de que su capacidad de movimiento del tren trasero se encuentra intacta) (tabla 20). Con respecto a la prueba de la regla de madera (Wood Rod Test), como se muestra en la figura 42A, se apreció un déficit de equilibrio en las viejas control ( $p < 0,001$ ) y horméticas ( $p < 0,01$ ) con un mayor % de caídas con respecto a las adultas-maduras. Sin embargo, en la coordinación motora (figura 42 B y C), reflejada de acuerdo a dos criterios distintos 1: % de animales que recorren al menos un segmento; 2: animales que completan la prueba, se observó mejores

porcentajes en las viejas que recibieron la hormetina, con respecto a las viejas control y con % parecidos a las adultas-maduras.



**Figura 42. Análisis de la capacidad sensoriomotora.** Equilibrio (representado como % animales que se caen de la tabla de madera) (A), **coordinación motora** (representada como % de segmentos recorridos y de prueba completada) (B y C), **vigor muscular** (representado como % de animales que se caen de la cuerda tirante y de prueba completada) (D y E) y **prensilidad** (representado como el porcentaje de animales con mejor prensilidad) (F). Adultas-maduras (n=10), viejas con hormesis (n=10), y viejas control (n=10). \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al grupo de viejas control. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto al grupo de adultas.

La prueba de la cuerda tirante muestra una clara reducción en el vigor muscular (ver figura 42 D) en las viejas, hecho que además se ve mejor en el grupo de viejas control (con 60% de caídas) en relación a las viejas con hormesis y



adultas-maduras control que mostraron un menor % de caídas, y que se ve reflejado también con la finalización de la prueba, donde se apreció que tanto el grupo de adultas-maduras como las viejas con hormesis tienen los mayores % de animales que realizaron la prueba con éxito con respecto al grupo de viejas controles (figura 42 E). Lo mismo ocurre con la prensilidad (figura 42 F), es decir, la capacidad de los animales de emplear todos los elementos posibles para permanecer agarrados a la cuerda sin caerse: patas delantera, patas traseras y cola, se observó que la prensilidad es elevada en adultas-maduras con un 87% y en viejas con hormesis 89% en relación a las viejas control.

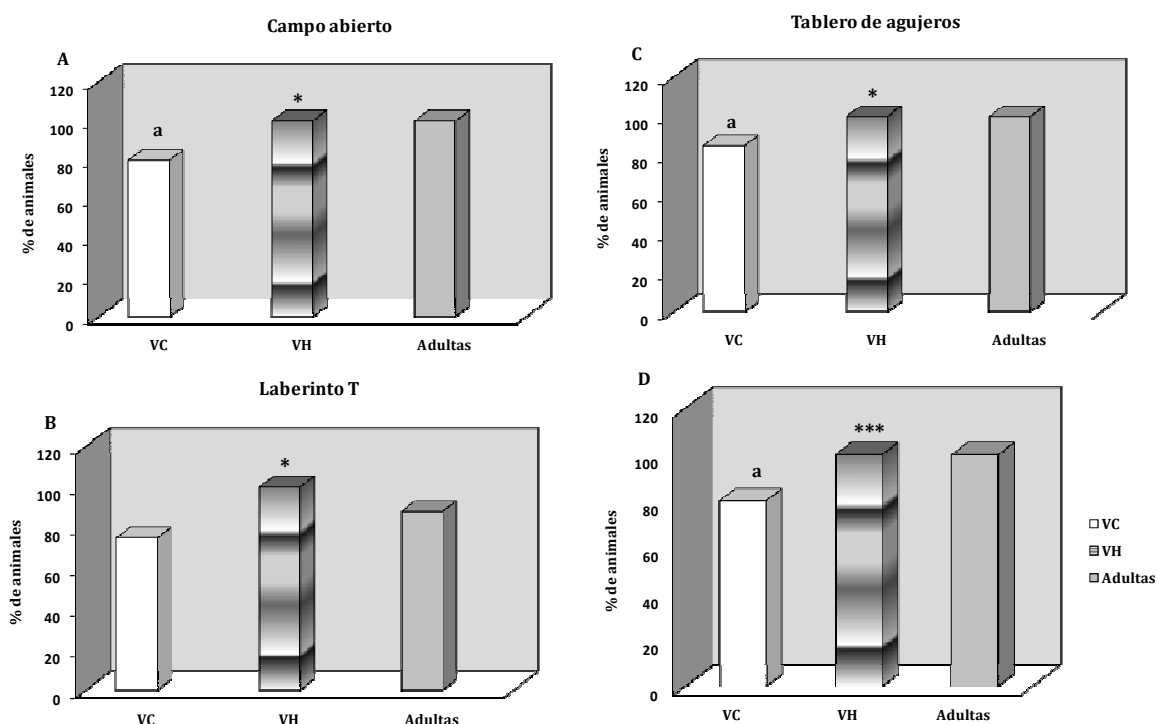
**Tabla 20.** Efectos del tratamiento hormético con LPS en algunos parámetros de capacidad sensoriomotora en ratonas ICR/CD1 viejas (84±2 semanas de edad).

Parámetros	Adultas	Viejas control	Viejas con hormesis
<b>A. Pesos (gr)</b>	50,21±1,85	46,24±2,32	41,77±2,12
<b>B. Capacidad sensoriomotora</b>			
<i>Reflejo visual</i>			
% Animales que presentan respuesta	100	90	100
<i>Reflejo de Extensión Posterior</i>			
% Animales que presentan respuesta	100	98	100
<i>Wood Rod Test</i>			
Equilibrio (% caídas)	10	48c	39b
Coordinación motora (% de recorrer 1 o más segmentos)	90	83	100*
Coordinación motora (% prueba completada)	90	70a	95**
<i>Cuerda Tirante (60 segundos)</i>			
b Vigor muscular (% caídas)	35	60c	38***
Vigor muscular (latencia caída)	49±9	34±12c	40±7
Coordinación motora (% de recorrer 1 o más segmentos)	65	30c	59**
Coordinación motora (% prueba completada)	53	9c	47***
Tracción (% prensilidad óptima)	87	69c	89**

Cada dato representa la media ± error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en viejas control. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas-maduras.

### Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad

En esta segunda sección (figura 43 y tabla 21), se incluyen las pruebas que son utilizadas para analizar la capacidad exploratoria de los animales (tanto horizontal como vertical) así como la aparición de probables conductas de ansiedad. Se realizaron durante el segundo, tercer y cuarto día de experimento.



**Figura 43. Actividad exploratoria vertical, representada como % de animales que realizan conducta de “rearing”, en las pruebas de campo abierto (A), laberinto T (B), tablero de agujeros (C) y actividad exploratoria dirigida del tablero de agujero, representada % animales que exploran agujeros (D).** Adultas-maduras (n=10), viejas con hormesis (n=10) y viejas control (n=10). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al grupo de viejas control. a  $P < 0,05$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

El segundo día se llevaron a cabo las pruebas de neofobia y campo abierto con pared. En la prueba de neofobia, todos los grupos muestran una actividad exploratoria horizontal (valorada como número de esquinas visitadas) y exhiben una actividad exploratoria vertical (conducta de “rearing”) similar (tabla 21). En relación al comportamiento de las adultas-maduras en la siguiente prueba, el

campo abierto, se caracterizaron por la rapidez con que abandonan el punto de salida y entran en periferia (no habiéndose detectado conducta de “freezing” o inmovilidad, lo que sería indicativo de niveles elevados de ansiedad). Además, destaca la intensa actividad exploratoria horizontal que desarrollan, con un elevado número de cuadrantes recorridos durante la prueba (representado en la tabla 21 como “deambulación total”), cubierto exactamente con la misma proporción en áreas externas e internas (tabla 21). Todos los animales mostraron conducta exploratoria vertical (figura 43 A), al contrario de la conducta de “grooming”, que aparece muy tarde y se produce muy poco (tabla 21). En relación al grupo viejas que recibieron la dosis de LPS como hormetina, se comportan, en líneas generales, como las adultas-maduras con 100% de animales con conducta de “rearing” (figura 43 A), a pesar de manifestar una deambulación inferior que las adultas-maduras control, no obstante es mayor en relación al grupo de viejas control (tabla 21). En contraparte, las viejas control muestran unas capacidades exploratorias reducidas (tanto a nivel horizontal como vertical). De este modo, el porcentaje de animales que exhiben conducta de “rearing” del 80% (figura 43 A) y con una deambulación menor a las adultas-maduras control.

Al día siguiente (tercer día en la secuencia de pruebas), los animales fueron sometidos a la prueba del tablero de agujeros (tabla 21). Uno de los primeros resultados que se observan es el aumento en viejas con hormesis sobre la actividad exploratoria no dirigida, tanto horizontal (valorada mediante la “deambulación total”) como vertical (estudiada como la conducta de “rearing”) similar a las adultas-maduras, y estadísticamente significativa en la conducta de rearing ( $p<0,05$ ) con respecto a las viejas control (figura 43 C). En cuanto a la actividad exploratoria dirigida, se evalúa gracias a los cuatro agujeros que se encuentran

situados en el tablero y que captan la atención de los animales al tener, dentro de cada uno de ellos, un objeto llamativo, también se apreció que el grupo que recibió la hormesis mostró un comportamiento exploratorio dirigido del 100% con respecto a las viejas control y similar a las adultas-maduras (figura 43 D).

**Tabla 21.** Efectos del tratamiento hormético con LPS en algunos parámetros de capacidad exploratoria y conducta de ansiedad en ratonas ICR/CD1 viejas (84±2 semanas de edad).

Parámetros	Adultas-maduras	Viejas control	Viejas con hormesis
<b><u>Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</u></b>			
<b><i>Corner Test</i></b>			
Número de esquinas visitadas	12,7±2,2	11,5±1,9	12,9±2,8
% Animales que presentan rearing	100	95	100
Número de rearings	6,3±2,4	4,7±2,6	5,5±2,9
<b><i>Campo abierto con pared</i></b>			
<b><i>Actividad horizontal</i></b>			
Tiempo salida centro (s)	3,7±2,4	5,9±2,5	3,1±1,16
Tiempo hasta entrar periferia (s)	5,8±2,3	9,8±3,5	6,7±1,6
Deambulaci3n total	490±115	290±128c	389±88*a
Deambulaci3n interna	250±120	130±50a	193±65
Deambulaci3n externa	265±63	182±79	234±49
<b><i>Actividad vertical</i></b>			
% Animales que presentan rearing	100	80a	100*
Número total de rearings	24±5	12±6	19±7
<b><i>Grooming</i></b>			
Número total de groomings	1,3±0,7	2,8±1,4	1,9±0,8
Latencia 1º grooming	170±55	103±42	147±77
<b><i>Defecaciones</i></b>			
Número de bolas fecales	4,8±2,9	3,5±1,8	3,9±1,6
% Animales que orinan	10	28	18
<b><i>Laberinto T</i></b>			
<b><i>Actividad horizontal</i></b>			
▸ Tiempo cruce intersecci3n	4,9±2,3	6,7±2,8	6,5±2,9
Eficiencia exploratoria (tiempo total)	26,8±10,5	26,4±12,5	24,9±13,4
<b><i>Actividad vertical</i></b>			
% Animales que presentan rearing	88	75	100*
Número total de rearings	0,9±0,7	0,5±0,4	1,4±0,9
<b><i>Tablero de agujeros</i></b>			
<b><i>Actividad exploratoria no dirigida</i></b>			
<b><i>Actividad horizontal</i></b>			

Tiempo salida al centro	2,33±1,23	5,00±1,34	4,27±1,2
Deambulación total	380±45	290±53	330±55
<b>Actividad vertical</b>			
% Animales que presentan rearing	100	85a	100*
Número total de rearings	25±5	11±6	16±7
<b>Actividad exploratoria dirigida</b>			
% Animales que exploran agujeros	100	80	100*
Tiempo total explorando agujeros	19±4	12±7	15±4
<b>Grooming</b>			
Número total de groomings	0,7±0,4	1,2±0,6	1,0±0,5
Latencia 1º grooming (s)	272±45	126±69	185±72
<b>Defecaciones</b>			
Número de bolas fecales	3,5±1,7	2,8±1,9	2,3±1,4
% Animales que orinan	9	12	13

Cada dato representa la media  $\pm$  error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor en viejas control. a $P<0,05$ , b $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor en adultas.

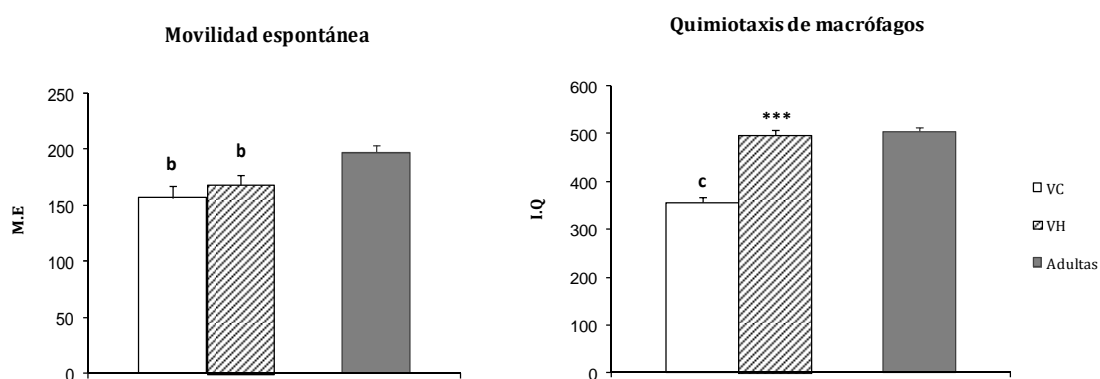
Por último, el cuarto día tiene lugar la prueba del laberinto en T, que se basa en la tendencia espontánea de los ratones para explorar nuevos espacios. Los resultados no mostraron diferencias en el comportamiento del grupo con hormesis con las viejas control con respecto a la actividad exploratoria horizontal (tabla 21), sin embargo en la actividad exploratoria vertical es mayor en el grupo que recibió la hormetina ( $p<0,05$ ) con respecto a las adultas-maduras y a las viejas control (figura 43 B).

#### 4.3.2. Estudio de las funciones inmunitarias:

##### Función de los macrófagos

Los resultados de las funciones más representativas de los macrófagos como la movilidad espontánea, quimiotaxis y la ingestión de agentes extraños (fagocitosis) y su posterior digestión mediante la producción de radicales libres como el anión superóxido, se muestran en las figuras 44 a la 46 y en la tabla 22.

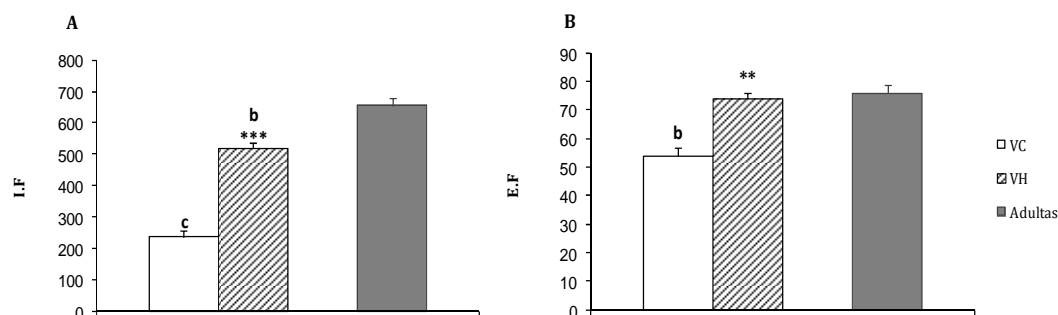
En la figura 44 se muestran los resultados de la *movilidad espontánea* (M.E) e *índice de quimiotaxis* (I.Q) de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas viejas con y sin hormesis. En la movilidad espontánea, no se observó cambios significativos del grupo con hormesis en relación a viejas control. Al comparar con las adultas-maduras, las viejas control como las tratadas con la hormesis mostraron una disminución ( $p<0,01$ ) de la M.E. En lo referente a la quimiotaxis, se apreció un aumento, que da lugar a una diferencia significativa ( $p<0,01$ ) en el grupo que recibió la hormetina con respecto al control. Con respecto a las adultas-maduras, sólo se observó una disminución en las viejas control ( $p<0,001$ ).



**Figura 44. Movilidad espontánea (M.E) e índice de quimiotaxis (I.Q) de macrófagos peritoneales (número de macrófagos por filtro) de ratonas ICR/CD1 viejas, tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. VC= Viejas control y VH=viejas con hormesis. \*\*\* $P<0,001$  con respecto a viejas control. b  $P<0,01$ , c  $P<0,01$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

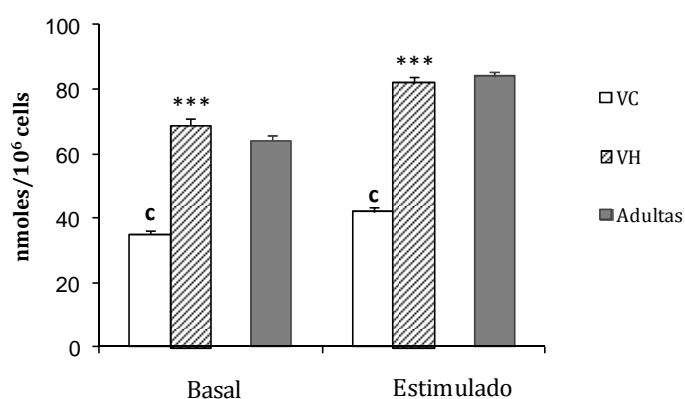
En relación a la *fagocitosis*, los resultados de índice y eficacia fagocítica se muestran en la figura 45 (A y B, respectivamente) y tabla 22. Se observó una elevación de estas funciones (I.F  $p<0,001$  y E.F  $p<0,01$ ), en los grupos que recibieron la hormetina con respecto al control (VC). Al comparar los resultados

con las adultas-maduras, las viejas control mostraron una disminución tanto en el I.F  $p<0,001$  como en la E.F  $p<0,01$ , y sólo se observó esa disminución en el I.F  $p<0,01$  en el grupo que recibió la administración de la hormetina.



**Figura 45. Índice de fagocitosis (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos) (A) y eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos) (B), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.** Cada columna representa la media ± el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. VC= Viejas control y VH=viejas con hormesis. \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto a viejas control. b  $P<0,01$ , c  $P<0,01$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

#### Anión superóxido intracelular

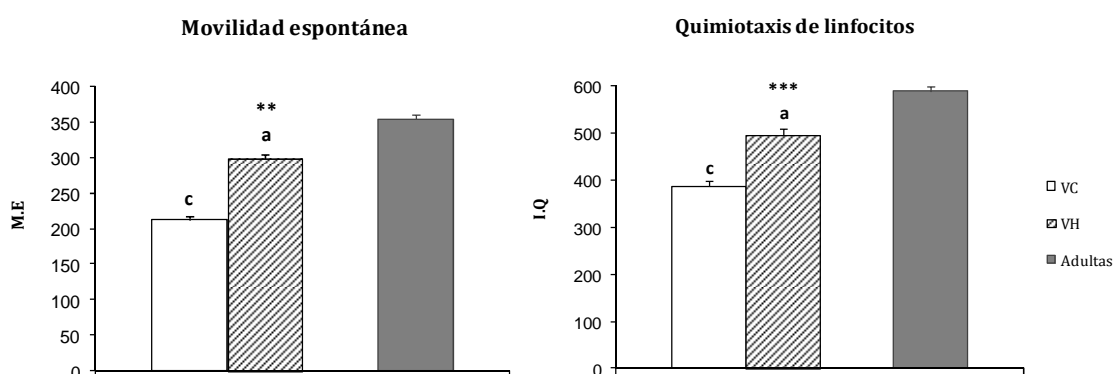


**Figura 46. Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/10<sup>6</sup> células) basal y bajo la estimulación con partículas de látex, de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.** Cada columna representa la media ± el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. VC= Viejas control y VH=viejas con hormesis. \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto a viejas control. c  $P<0,01$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

Los resultados correspondientes a los niveles intracelulares de *anión superóxido* ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células), se muestran en la figura 46 y la tabla 22. En lo que respecta a las diferencias del grupo con hormesis (VH) y su respectivo grupo control (VC), estadísticamente los niveles tanto basales como estimulados con las partículas de látex son mayores ( $p < 0,001$ ), en el grupo que recibió la hormetina llegando a los niveles observados en adultas-maduras. Si comparamos los resultados obtenidos con las adultas-maduras, se observó una disminución significativa tanto en a nivel basal y estimulado en viejas control ( $p < 0,001$ ).

### **Función de los linfocitos**

Las funciones analizadas en linfocitos han sido su capacidad de migración espontánea o a un foco antigénico (quimiotaxis) (figura 47 y tabla 22).



**Figura 47. Movilidad espontánea (M.E) e índice de quimiotaxis (I.Q) de linfocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. VC= Viejas control y VH=viejas con hormesis. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto a viejas control. a  $P < 0,05$ , c  $P < 0,01$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

En los resultados obtenidos para la *movilidad espontánea* y la *quimiotaxis*, después de inducir la hormesis, se apreció un aumento significativo de éstos



parámetros ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ , respectivamente) con respecto al grupo control (VC). En cuanto a los resultados obtenidos con relación a las adultas-maduras, se observó una disminución de M.E e I.Q tanto en el grupo control (VC) ( $p<0,001$ ) como el tratado con la hormetina (VH) ( $p<0,05$ ).

### **Actividad Natural killer**

En lo que respecta a los resultados de la actividad NK (expresada como % lisis) de los leucocitos peritoneales, se muestra en la figura 48 y la tabla 22. El efecto de la administración de las bajas dosis de LPS, supuso un aumento de la actividad NK en el grupo con hormesis (VH) ( $p<0,01$ ) con respecto a los controles (VC). En comparación a las adultas-maduras sólo se mostró una disminución en viejas control ( $p<0,001$ ).

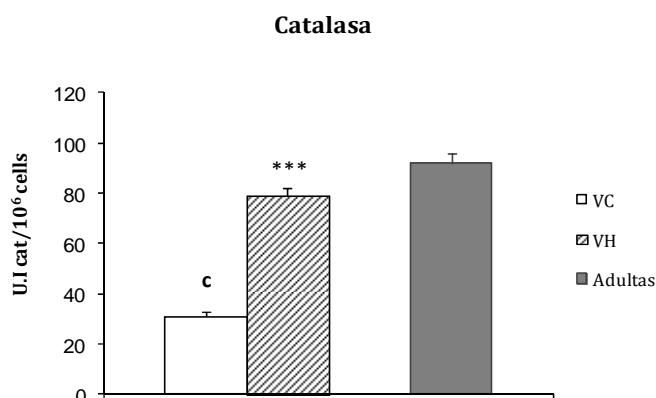


**Figura 48. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de linfocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. VC= Viejas control y VH=viejas con hormesis. \*\* $P<0,01$  con respecto a viejas control. c $P<0,01$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

### 4.3.3 Defensa antioxidante y compuestos oxidantes

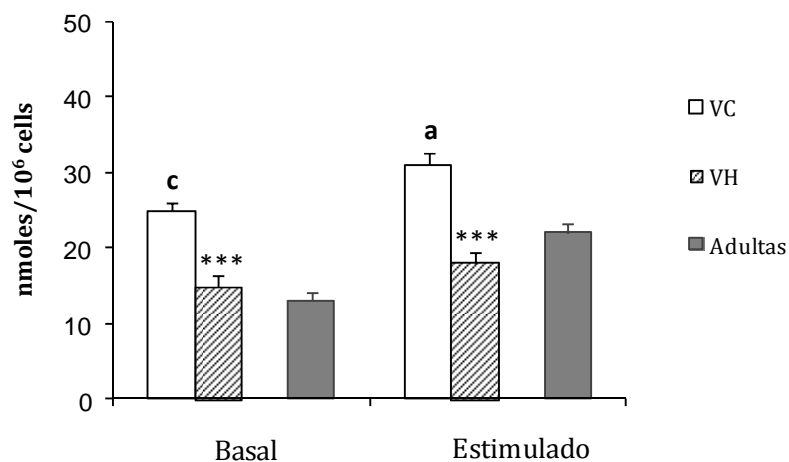
Los resultados obtenidos en el análisis de la defensa antioxidante (actividad de catalasa), así como, el oxidante (niveles de anión superóxido extracelular) de leucocitos peritoneales de ratonas viejas y adultas-maduras, se muestran en la figuras 49 y 50.

La actividad *catalasa* tras la administración de la hormetina (LPS) (figura 49), propicio una elevación en el grupo con hormesis ( $p<0,001$ ) con respecto a las viejas control (VC). Los resultados obtenidos en relación a las adultas-maduras, sólo mostró una disminución en el grupo que no recibió la hormesis (VC).



**Figura 49. Actividad de la catalasa (U.Icat/10<sup>6</sup> células) de linfocitos peritoneales, procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. VC= Viejas control y VH=viejas con hormesis. \*\*\* $P<0,001$  con respecto a viejas control. c $P<0,01$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

## Anión superóxido extracelular



**Figura 50. Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y bajo la estimulación con partículas de látex, de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. VC= Viejas control y VH=viejas con hormesis. \*\*\* $P < 0,001$  con respecto a viejas control. a  $P < 0,05$ , c $P < 0,001$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

En lo que respecta a los niveles de *anión superóxido extracelular* (figura 50), se observó una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en las viejas con hormesis, tras recibir la administración de la dosis bajas de LPS durante la edad madura, tanto en situación basal como estimulada. Por el contrario, el grupo que no recibió la hormesis mostró un aumento estadísticamente significativo tanto a nivel basal ( $p < 0,001$ ) como estimulado ( $p < 0,05$ ) con respecto a las adultas-maduras.

**Tabla 22.** Parámetros de función inmunitaria y estado redox de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas tras la administración de 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses.

Parámetros	Unidades	Adultas-maduras	Viejas control	Viejas con hormesis
		Edad (sem)		
Función inmunitaria		84±2	84±2	55±2
Movilidad espontánea de macrófagos	M.E	197±7	157±10b	169±8b
Quimiotaxis de macrófagos	I.Q	504±10	356±12c	498±9***
Fagocitosis de macrófagos				
Índice fagocítico	I.F	656±23	236±21c	522±16***b
Eficacia fagocítica	E.F	76±3	54±3b	74±2**
Anión superóxido intracelular de macrófagos		nmoles/10 <sup>6</sup> cél		
Basal		64±1,6	35±1,4c	69±1,7***
Estimulado		84±1,5	42±1,5c	82±1,7***
Movilidad espontánea de linfocitos	M.E	354±7	212±9c	298±6a**
Quimiotaxis de linfocitos	I.Q	589±10	387±10c	497±11a***
Actividad natural killer (NK)	%	58±4	37±3c	53±4**
Estado redox				
Antioxidante				
Catalasa (CAT)	U.I cat/10 <sup>6</sup> cél	92±4	31±2c	79±3***
Oxidante				
Anión superóxido extracelular		nmoles/10 <sup>6</sup> cél		
Basal		13±1,2	25±0,9c	15±1,5***
Estimulado		22±1,3	31±1,3a	18±1,5***

Cada dato representa la media ± error estándar de 10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P<0,001$  con respecto a viejas control. a  $P<0,05$ , c $P<0,001$  con respecto al grupo de adultas-maduras.

#### 4.3.B. Efecto del tratamiento hormético en ratonas maduras con envejecimiento prematuro.

En el apartado anterior se ha estudiado el efecto de la hormesis con la administración de bajas dosis de LPS sobre parámetros de conducta, y de función inmunitaria y estrés oxidativo de leucocitos peritoneales procedentes de hembras ICR-CD1 cronológicamente viejas (84±2 semanas de edad), mientras que en el presente apartado el interés se centra, sobre cómo actúa la administración de la hormetina (LPS) en algunas funciones inmunitarias y de estrés oxidativo en ratonas ICR-CD1 clasificadas como NPAM (de las siglas en inglés “non prematurely

aging mice”) y PAM (de las siglas en inglés de “prematurely aging mice”) a la edad de  $55\pm 2$  semanas, y a la edad de  $84\pm 2$  semanas, en los parámetros de conducta (previo al shock endotóxico), función inmunitaria y de estrés oxidativo tras la administración de una dosis letal 50mg/kg de LPS. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 51 a la 63 y en las tablas 23 a la 25.

#### 4.3.4. Función inmunitaria y estrés oxidativo de ratonas maduras PAM y NPAM con hormesis.

A continuación se exponen, en primer lugar, los resultados correspondientes a las ratonas PAM y NPAM maduras ( $55\pm 2$  semanas de edad), tras el efecto de la hormesis durante dos meses (tabla 23).

**Tabla 23:** Cambios en parámetros de función inmunitaria y de estado redox de leucocitos peritoneales de ratones maduros inyectados con LPS como hormetina (0,1mg/kg), durante dos meses en cuatro sesiones con intervalos de 15 días por sesión.

Parámetros		NPAM		PAM	
Función inmunitaria	Unidades	Control	Hormesis	Control	Hormesis
<b>Fagocitosis de macrófagos</b>					
<i>Índice fagocítico</i>	I.F	861 $\pm$ 12	1487 $\pm$ 24*	893 $\pm$ 15	1141 $\pm$ 21*
<i>Eficacia fagocítica</i>	E.F	82 $\pm$ 2	85 $\pm$ 3	79 $\pm$ 2	84 $\pm$ 4
<b>Anión superóxido intracelular de macrófagos</b>	(nmoles/ $10^6$ cél)				
<i>Basal</i>		61,84 $\pm$ 8	68,58 $\pm$ 5	17,07 $\pm$ 2c	24,70 $\pm$ 3***
<i>Estimulado</i>		82,88 $\pm$ 7	80,92 $\pm$ 6	32,83 $\pm$ 4c	52,46 $\pm$ 5***
<b>Actividad natural killer (NK)</b>	%	40 $\pm$ 2	79 $\pm$ 3**	51 $\pm$ 4	81 $\pm$ 2**
<b>Estado redox</b>					
<b>Catalasa (CAT)</b>	(U.I cat/ $10^6$ cél)	26,51 $\pm$ 4	33,73 $\pm$ 6*	27,36 $\pm$ 4	145,20 $\pm$ 5***
<b>Anión superóxido extracelular</b>	(nmoles/ $10^6$ cél)				
<i>Basal</i>		17,20 $\pm$ 4	14,03 $\pm$ 5	18,19 $\pm$ 5	16,87 $\pm$ 4
<i>Estimulado</i>		25,85 $\pm$ 3	23,17 $\pm$ 4	25,57 $\pm$ 5	22,56 $\pm$ 3

Cada dato representa la media  $\pm$  error estándar de 8 ratones (PAM) y 8 ratones (NPAM) maduro por cada grupo, realizado cada parámetro por duplicado y correspondientes al mismo número de animales por grupo. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a su control. \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en los NPAM. <sup>c</sup>  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor entre los grupos controles.

Los parámetros de función inmunitaria y estado redox de los leucocitos peritoneales, de las ratonas PAM después del tratamiento de hormesis, muestran un aumento significativo en la actividad NK y de la enzima antioxidante CAT con respecto a su control. A pesar de ello, mantienen valores menores en los niveles de anión superóxido intracelular tanto basal como estimulado y la actividad CAT con relación a las ratonas NPAM control. Por otro lado, los ratonas NPAM que se les administró la hormetina, sólo muestran aumentos significativos en el índice fagocítico ( $p<0,05$ ), CAT ( $p<0,01$ ) y NK ( $p<0,01$ ) con respecto a los controles (tabla 23).

#### **4.3.5. Parámetros de conducta, función inmunitaria y estrés oxidativo de ratonas viejas NPAM y PAM con hormesis, tras ser sometidas a un shock endotóxico.**

A continuación se exponen, los resultados correspondientes a los parámetros de comportamiento, función inmunitaria y de estado oxidativo de ratonas viejas PAM y NPAM con shock endotóxico, sometidas a la administración de la dosis bajas de LPS como hormetina durante su edad madura.

#### **Efecto de la hormesis sobre el estado conductual de los animales**

Para iniciar la batería de pruebas de comportamiento al igual que el apartado 4.3.A. se tomó en cuenta el peso en gramos de cada uno de los grupos incluidos en el estudio. El análisis de los pesos no mostró diferencias significativas entre las viejas NPAM control ( $38,10\pm 2,24$ ), NPAM con hormesis ( $44,00\pm 1,58$ ), PAM control ( $43,45\pm 2,42$ ) y PAM con hormesis ( $42,66\pm 2,21$ ).

Seguidamente, se abordaron una amplia batería de parámetros, que pueden agruparse en dos conjuntos claramente diferenciados y cuyos resultados se presentan en las figuras 51 y 52 y la tabla 24. La primera sección (parte A, tabla 24) está constituida por diferentes pruebas que evalúan la capacidad sensoriomotora de los animales, mientras que la segunda sección (parte B, tabla 24) se compone de pruebas que analizan la capacidad exploratoria así como la aparición de posibles conductas de ansiedad.

### ***Capacidad sensoriomotora***

En esta sección se evalúan los reflejos, el equilibrio, la coordinación motora, el vigor muscular y la prensilidad empleada por los animales. Todos estos parámetros se realizan el primer día de ensayos conductuales.

En lo que respecta, a la capacidad de los animales de exhibir reflejos, tales como el reflejo visual y el reflejo de extensión de las patas posteriores no se encuentran perjudicados en todos los grupos analizados (tabla 24). En cuanto a la coordinación motora, en la prueba de la tabla de madera, se observó un aumento en el % de los animales que recorren al menos 1 segmento en los PAM con hormesis con respecto a los controles y NPAM con hormesis ( $p<0,001$ ), mientras que el % más elevado que completan la prueba con éxito, se apreció en los NPAM con hormesis ( $p<0,001$ ) con relación a los controles (figura 51 A y B). Por su parte, en la prueba de la cuerda tirante no se apreció ese aumento en el % en los grupos que recibieron la hormetina, tanto los NPAM como PAM en el recorrido de los segmentos con relación a los grupos controles (figura 51 C y D).

La prueba de la cuerda tirante muestra una clara reducción en el vigor muscular, hecho más visible en los animales NPAM tanto control como horméticos (con segundos de latencia menores que los PAM) (figura 51 E). La capacidad de los animales de emplear todos los elementos posibles para permanecer agarrados a la cuerda sin caerse, como la capacidad de prensibilidad óptima, se apreció mayor en los animales NPAM ( $p<0,001$ ) y PAM ( $p<0,05$ ) con hormesis con relación a los controles (figura 51 F).

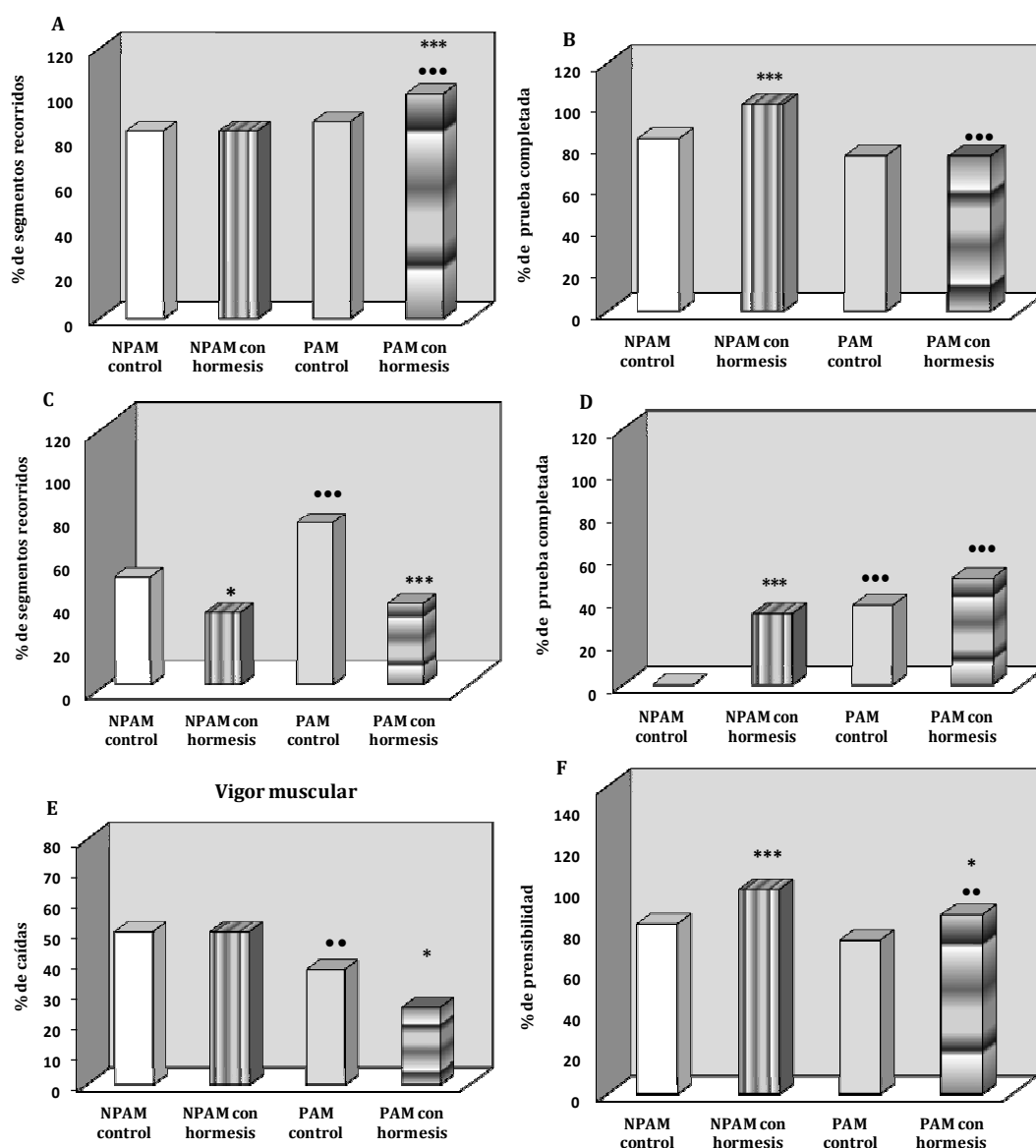
### ***Capacidad exploratoria y conducta de ansiedad***

Las pruebas que se incluyen en esta sección sirven para analizar la capacidad exploratoria de los animales, así como la aparición de posibles conductas de ansiedad. Se realizaron durante el segundo, tercer y cuarto días de experimento.

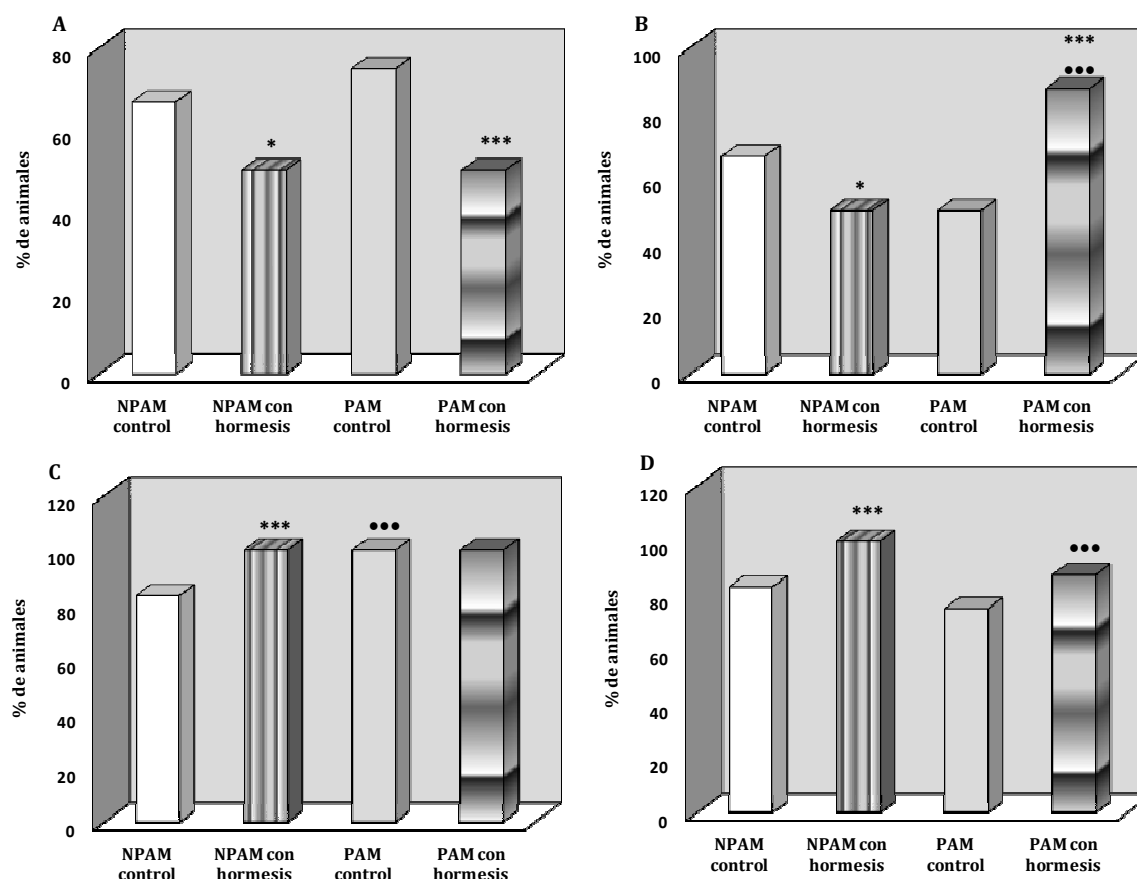
En la prueba de neofobia, todos los grupos muestran una actividad exploratoria horizontal (valorada como número de esquinas visitadas) y exploratoria vertical (conducta de “rearing”) similar (tabla 24). Con respecto al comportamiento en la siguiente prueba, el campo abierto, no se aprecio diferencias significativas entre los grupos analizados en la rapidez con que abandonan el punto de salida y entran en periferia. Sin embargo, todos los grupos manifiestan una intensa actividad exploratoria horizontal, con un elevado número de cuadrantes recorridos durante la prueba representado como “deambulación total”. En cuanto a la conducta exploratoria vertical, tanto los animales PAM como NPAM con hormesis, mostraron menores números totales de “rearing” con relación a los controles, y con un menor % en los animales con hormesis de realizar el primer “rearing” en el minuto 1 (figura 52 A), hecho contrario de la conducta de



“grooming”, que aparece mayor en los grupos con hormesis (con el mayor % que lo realizan en los PAM) (tabla 24).



**Figura 51. Análisis de la capacidad sensoriomotora. Coordinación motora** (representada como % de segmentos recorridos y de prueba completada del *Wood Rod Test* y de la *Cuerda Tirante*) (A, B, C y D), **vigor muscular** (representado como % de animales que se caen de la cuerda tirante) (E) y **prensilidad** (representado como % de animales con mejor prensilidad) (F). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor de su control. •• $P < 0,01$ , ••• $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en los NPAM.



**Figura 52.** Actividad exploratoria vertical, representada como % de animales que realizan conducta de “rearing”, en las pruebas de campo abierto [% de animales que realizan el “rearing” en el 1<sup>er</sup> minuto (A) y que realizan “rearing” de centro (B)], laberinto T (C) y actividad exploratoria dirigida del tablero de agujeros, representada % animales que exploran agujeros (D). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en el grupo control. \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en el grupo de NPAM.

En la prueba del tablero de agujeros, uno de los primeros resultados que se observó fue la disminución ( $p < 0,01$ ) sobre la actividad exploratoria no dirigida, tanto horizontal como vertical en el grupo PAM con hormesis con respecto a su grupo control. En cuanto a la actividad exploratoria dirigida, se apreció un 100% conducta exploratoria en los animales NPAM con hormesis con respecto a los controles (figura 52 D), hecho que también se ve relegado, en la rapidez en tiempo de búsqueda del primer agujero, a pesar de no presentar diferencias significativas (tabla 24). Por su parte, la conducta de “grooming” se ve incrementada en los

animales PAM horméticos con relación a los controles y al grupo NPAM horméticos ( $p<0,001$  y  $p<0,01$ , respectivamente) (tabla 24).

Finalmente, tiene lugar la prueba del laberinto en T, los resultados muestran que la hormesis no ejerce un efecto en la capacidad exploratoria a nuevos espacios, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos, y además hay una tendencia reducida en el comportamiento exploratorio horizontal, ya que los animales necesitan mayor tiempo para cruzar la intersección del laberinto, así como para explorarlo por completo (eficiencia exploratoria). Sin embargo, mostraron una mayor actividad exploratoria vertical ( $p<0,001$ ) los grupos con hormesis con relación a los controles, con diferencia significativa ( $p<0,001$ ) en los NPAM (figura 52 C y tabla 24).

**Tabla 24.** Efectos del tratamiento hormético con LPS en algunos parámetros de la capacidad sensoriomotora, exploratoria y conducta de ansiedad en ratonas ICR/CD1 viejas PAM y NPAM (84±2 semanas de edad).

Parámetros	Npam Hormesis	Npam control	Pam Hormesis	Pam control
<b>A. Pesos (g)</b>	44,00± 6,58	38,10± 3,56	42,68±3,61	43,45±4,52
<b>B. Capacidad sensoriomotora</b>				
<b>Reflejo visual</b>				
% Animales que presentan respuesta	100	100	100	100
<b>Reflejo de Extensión Posterior</b>				
% Animales que presentan respuesta	100	100	99	98
<b>Wood Rod Test</b>				
Equilibrio (% caídas)	0	0	0	0
Equilibrio (latencia caída)	0	0	0	0
Coordinación motora (segmentos recorridos)	3,00± 0,87	4,75± 1,34	2,81±0,36	3,56±1,58
Coordinación motora (% de recorrer 1 o más segmentos)	83,3	83,3	100***•••	87,5
Coordinación motora (% prueba completada)	100***	83,3	75•••	75
Coordinación motora (latencia llegada)	15,86± 3,5	16,07± 2,9	11,91±3,8	13,01±2,8
<b>Cuerda Tirante (60 segundos)</b>				
Vigor muscular (% caídas)	50	50	25*••	37,5••
Vigor muscular (latencia caída)	34,78± 12	34,52± 13	38,94±11*	56,86±3,81•
Coordinación motora (segmentos recorridos)	0,83± 0,33	0,83± 0,41	1,13±0,5	1,75±0,5
Coordinación motora (% de recorrer 1 o más segmentos)	33,33*	50	37,5***	75•••

	Coordinación motora (% prueba completada)	33,33***	0	50•••	37,5•••
►	Tracción (% prensilidad óptima)	100***	83	87,5*••	75

### C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

<b>Corner Test</b>					
	Número de esquinas visitadas	11,50± 0,47	11,50± 2,59	12,50±0,47	12,63±2,29
	% Animales que presentan rearing	100	100	100	100
	Número de rearings	6,17± 1,31	5,00± 1,34	4,75±1,38	5,50±1,21
<b>Campo abierto con pared</b>					
<b>Actividad horizontal</b>					
	Tiempo salida centro	5,17± 1,37	5,33± 1,34	3,38±0,69	4,50±1,61
	Tiempo hasta entrar periferia	8,83± 2,30	8,70± 1,72	5,75±0,37	7,00±2,29
	Deambulación total	324± 49,42*	478± 47,0	321±25,37	385±37,96
	Deambulación externa	199± 43,31	232± 24,00	214±28,35	251±43,25
	Deambulación interna	125± 65,54	246± 75,7	107±33,19	134±18,38
	% Deambulación interna del total	38,58	51,46	33,33	34,81•
<b>Actividad vertical</b>					
	% Animales que presentan rearing	100	100	100	100
	Número total de rearings	13,67± 4,33*	22,50± 2,16	16,63±4,31	21,38±3,49
►	% Animales que realizan rearing en 1º minuto	50*	66,66	50***	75
►	Latencia 1º rearing	61,50± 23,26	72,50± 15,26	93±36,14	61,13±22,08
	% Animales que realizan rearing central	50*	66,66	87,5***•••	50•
<b>Grooming</b>					
	% Animales que realizan grooming	83,33	83,33	100•••	100•••
	Número total de groomings	4,33± 1,20	1,83± 0,13	3,13±0,11	2,25±0,49
	Latencia 1º grooming	137,67± 52,40	104,00± 29,85	97,25±28,19	132,25±17,22
<b>Defecaciones</b>					
	% Animales que defecan	83,33	83,33	100•••	100•••
	Número de bolas fecales	3,83± 1,20	3,08± 1,31	4,13±1,23	3,88±1,30
	% Animales que orinan	33,33**	16,66	25•	25
<b>Laberinto T</b>					
<b>Actividad horizontal</b>					
►	Tiempo cruce intersección	5,50± 1,41	4,83± 0,33	6,50±1,11	5,38±0,19
	Eficiencia exploratoria (tiempo total)	25,83± 7,26	25,67± 6,11	24,88±3,56	25,50±6,02
<b>Actividad vertical</b>					
	% Animales que presentan rearing	100***	83	87,5•••	75
	Número total de rearings	1,02± 0,09	0,42± 0,12	0,28±0,11	0,47±0,38
<b>Grooming</b>					
	% Animales que realizan grooming	0	0	0	0
<b>Defecaciones</b>					
	% Animales que defecan	25	12,5	0***•••	12,5
	Número de bolas fecales	0,33± 0,32	0,17± 0,21	0	0,13±0,14
<b>Tablero de agujeros</b>					
<b>Actividad exploratoria no dirigida</b>					
<b>Actividad horizontal</b>					
	Tiempo salida al centro	4,33± 1,20	5,00± 1,29	4,25±0,04	5,00±0,32
	Deambulación total	329± 25,18	320± 30,03	294±15,07**	362±21,32

Deambulación externa	203± 21,92	206± 32,12	193±16,21*	240±15,32
Deambulación interna	127± 18,44	113± 27,33	102±10,21	122±13,21
<b>Actividad vertical</b>				
% Animales que presentan rearing	100	100	100	100
Número total de rearings	14,50± 6,35	12,00± 3,30	12,25±2,21**	22,13±2,23••
Latencia 1º rearing	23,33± 12,01	24,80± 9,78	38,38±9,98	30,38±5,43
% Animales que realizan rearing central	0	0	0***	25•••
<b>Actividad exploratoria dirigida</b>				
% Animales que exploran agujeros	100***	83,33	100	100•••
Tiempo hasta 1º agujero	1,17± 0,07	1,42± 0,06	1,75±0,04	2,25±0,23
Número total de exploraciones en agujeros	11,67± 2,44	12,67± 3,21	13,00±2,12	12,50±2,13
Tiempo total explorando agujeros	12,58± 3,36	13,50± 4,24	14,31±1,30	14,06±3,21
<b>Grooming</b>				
% Animales que realizan grooming	83,33	83,33	100***••	75
Número total de groomings	1,00± 0,23	1,00± 0,21	1,38±0,04	1,13±0,22
Latencia 1º grooming	133± 18,84	149± 32,08	182±34,32	123±23,21
<b>Defecaciones</b>				
% Animales que defecan	50	50	100***•••	62.5
Número de bolas fecales	1,83± 1,4	2,00± 1,10	2,75±0,23	2,3±1,3
% Animales que orinan	0	0	12,5•••	12.5•••

Cada dato representa la media ± error estándar de 8 ratones (PAM) y 8 ratones (NPAM) viejas por cada grupo, realizado cada parámetro por duplicado y correspondientes al mismo número de animales por grupo. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a su control. •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en los NPAM.

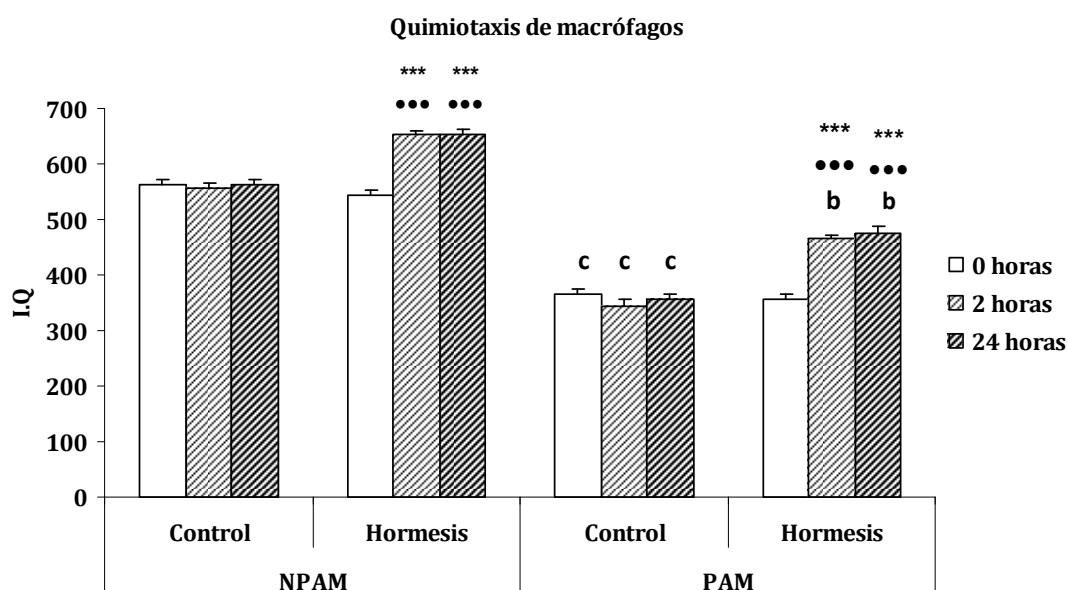
## **Estudio de la función inmunitaria**

### **Capacidad funcional de los macrófagos**

Siguiendo la dinámica de los apartados anteriores, se han analizado algunas de sus funciones más típicas, como la quimiotaxis, la ingestión de agentes extraños (fagocitosis) y su posterior digestión mediante la producción de radicales libres como el anión superóxido.

En la figura 53 y la tabla 25, se recogen los datos obtenidos en relación al *índice de quimiotaxis* (I.Q) de macrófagos peritoneales procedentes de los distintos grupos de estudio. En este parámetro se observó un aumento significativo ( $p<0,001$ ) en los grupos NPAM y PAM con hormesis con relación al grupo control. Con respecto al tiempo inicial 0 horas, se observó un incremento significativo tanto en NPAM como PAM a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ) tras recibir la endotoxina. Al comparar los grupos

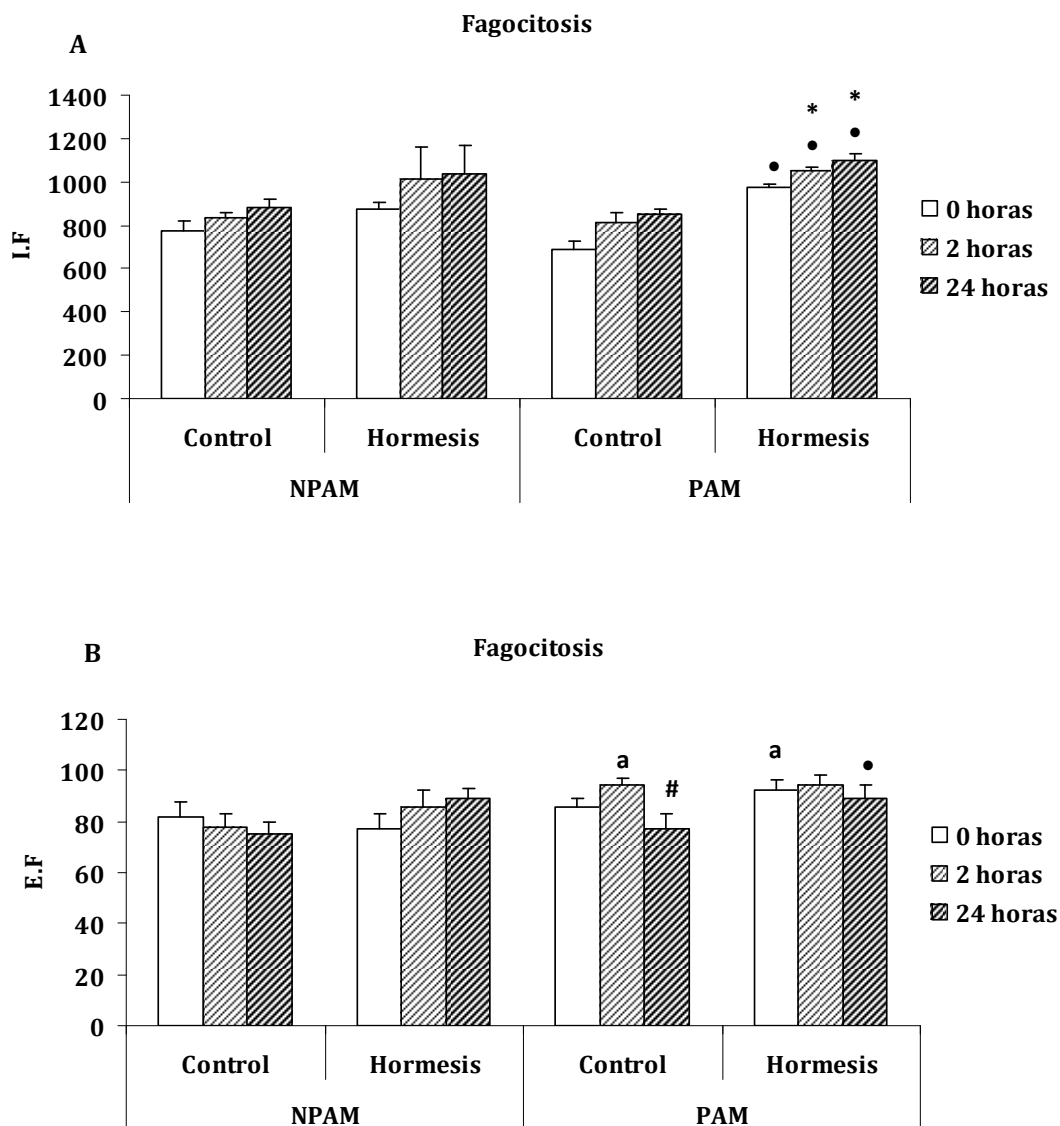
PAM con respecto a los NPAM, se apreció una disminución tanto en el grupo control y con hormesis (0, 2 y 24 horas  $p < 0,001$  y a las 2 y 24 horas  $p < 0,01$ , respectivamente).



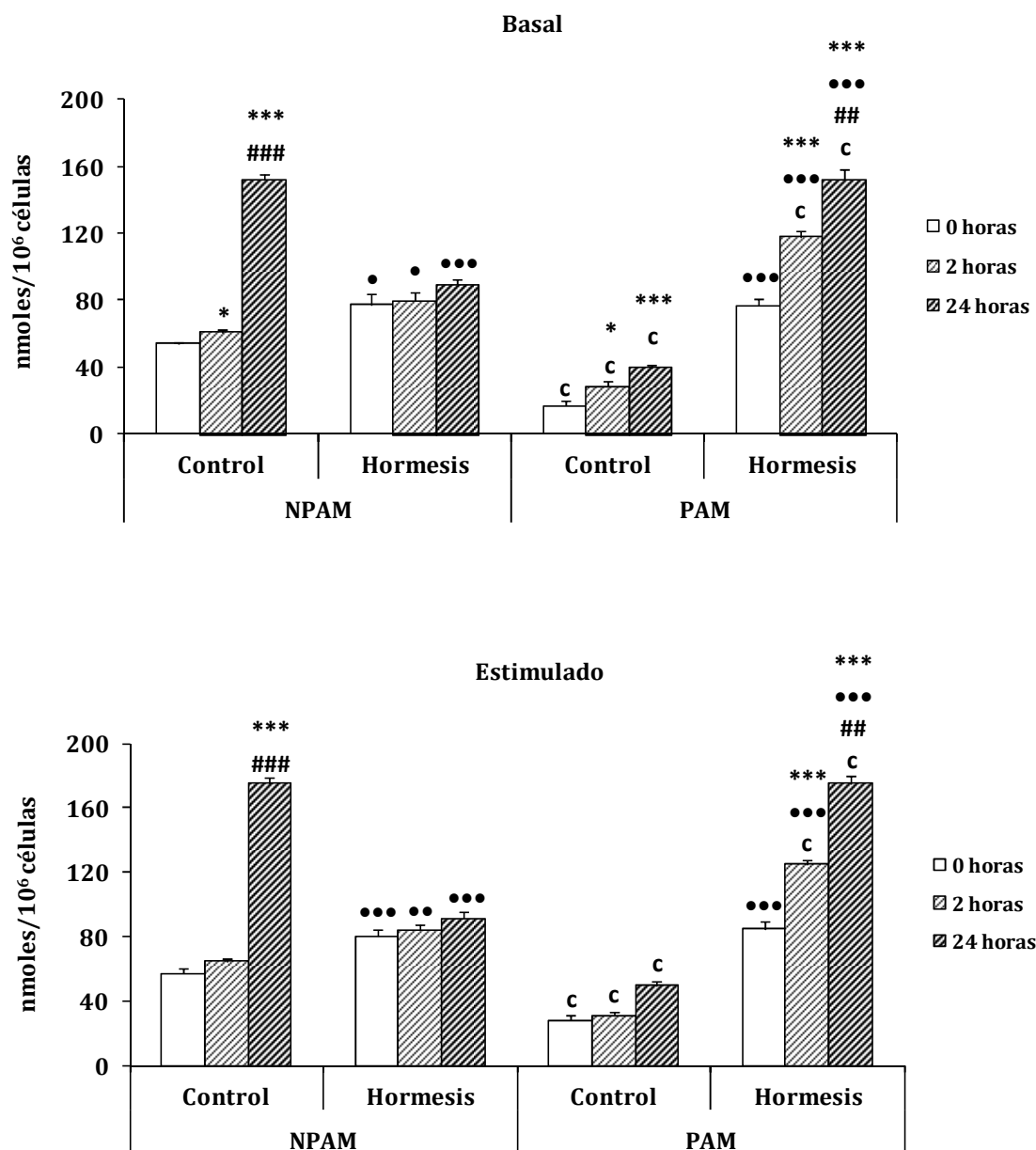
**Figura 53. Índice de quimiotaxis (I.Q.) de macrófagos peritoneales (número de macrófagos por filtro) procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ••• $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las NPAM.

Con respecto a la *fagocitosis*, los resultados de índice y eficacia fagocítica se muestran en la figura 54A y 54B y tabla 25, respectivamente. En el I.F sólo se observó una elevación a las 2 y 24 horas ( $p < 0,05$ ) con respecto al valor inicial (0 horas) en el grupo PAM con hormesis, así mismo se apreció en este grupo aumentos significativos a las 0, 2 y 24 horas ( $p < 0,05$ ) con relación al su grupo control. En lo que respecta a la E.F no se observó diferencias significativas, sin embargo, al comparar con los controles sólo se mostró una diferencia significativa a las 24 horas ( $p < 0,05$ ) tras recibir la endotoxina en el grupo PAM con hormesis. A las 24 horas con respecto a las 2 horas, se observó un descenso significativo

( $p<0,05$ ) en viejas PAM control. En comparación con las viejas NPAM, se dio un aumento en viejas PAM control a las 24 horas ( $p<0,05$ ) y en viejas PAM con hormesis a las 0 horas ( $p<0,05$ ).



**Figura 54.** Índice de fagocitosis (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos) (A) y eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos) (B), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a los controles. a  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las NPAM.



**Figura 55.** Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y bajo la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 0 horas. ##  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control.

Los resultados correspondientes a los niveles intracelulares de *anión superóxido* ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células), se muestran en la figura 55 y la tabla 25. Se



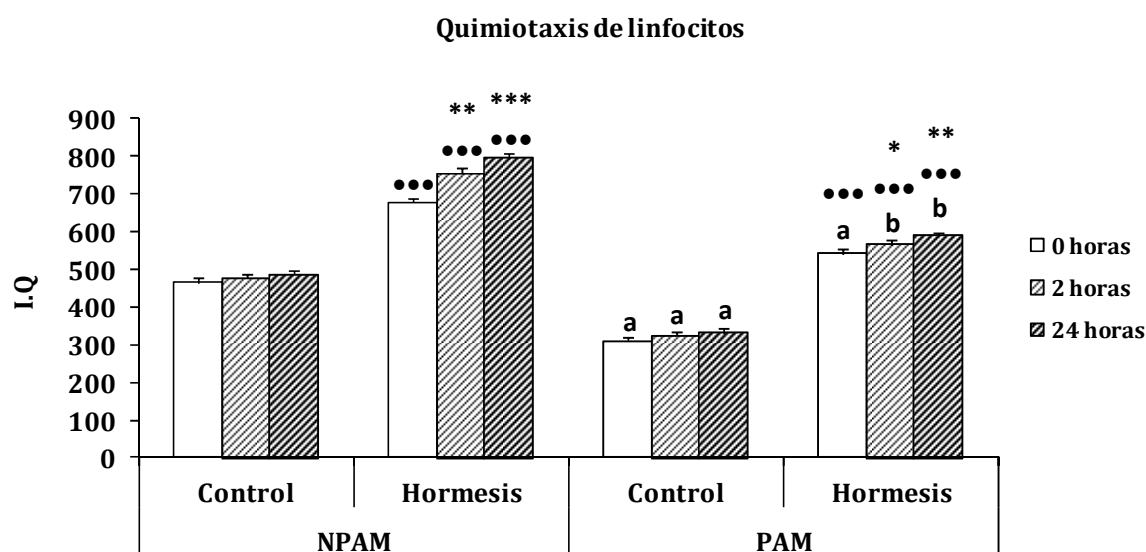
observó a las 2 y 24 horas, en general, que tras la administración de la endotoxina se da un aumento de estos niveles, tanto en basales (con excepción en viejas NPAM con hormesis) como en la estimulada (con excepción en viejas PAM control) con respecto al tiempo inicial (0 horas). Los valores a 24 horas con respecto a las de 2 horas, se observó un aumento en viejas NPAM control ( $p<0,001$ ) y PAM con hormesis ( $p<0,01$ ), tanto en los valores basales como en los estimulados.

Al comparar los resultados obtenidos con los respectivos controles, se pareció un aumento a las 0 y 2 horas, y una disminución a las 24 horas en las viejas NPAM con hormesis tanto en el estado basal como estimulado, mientras las viejas PAM con hormesis manifestaron un aumento significativos a las 0, 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ). Con respecto a los valores obtenidos en las viejas PAM con relación a las NPAM, se mostraron disminuciones significativas a las 0, 2 y 24 horas en las viejas PAM control ( $p<0,001$ ), hecho contrario en las viejas PAM con hormesis donde se observó un aumento significativo a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ). Por otro lado, los valores obtenidos en el estado estimulado con relación al estado basal, se apreció aumentos significativos a las 24 horas en las viejas NPAM control y en viejas PAM con hormesis ( $p<0,05$ ) (tabla 25).

### **Capacidad funcional de los linfocitos**

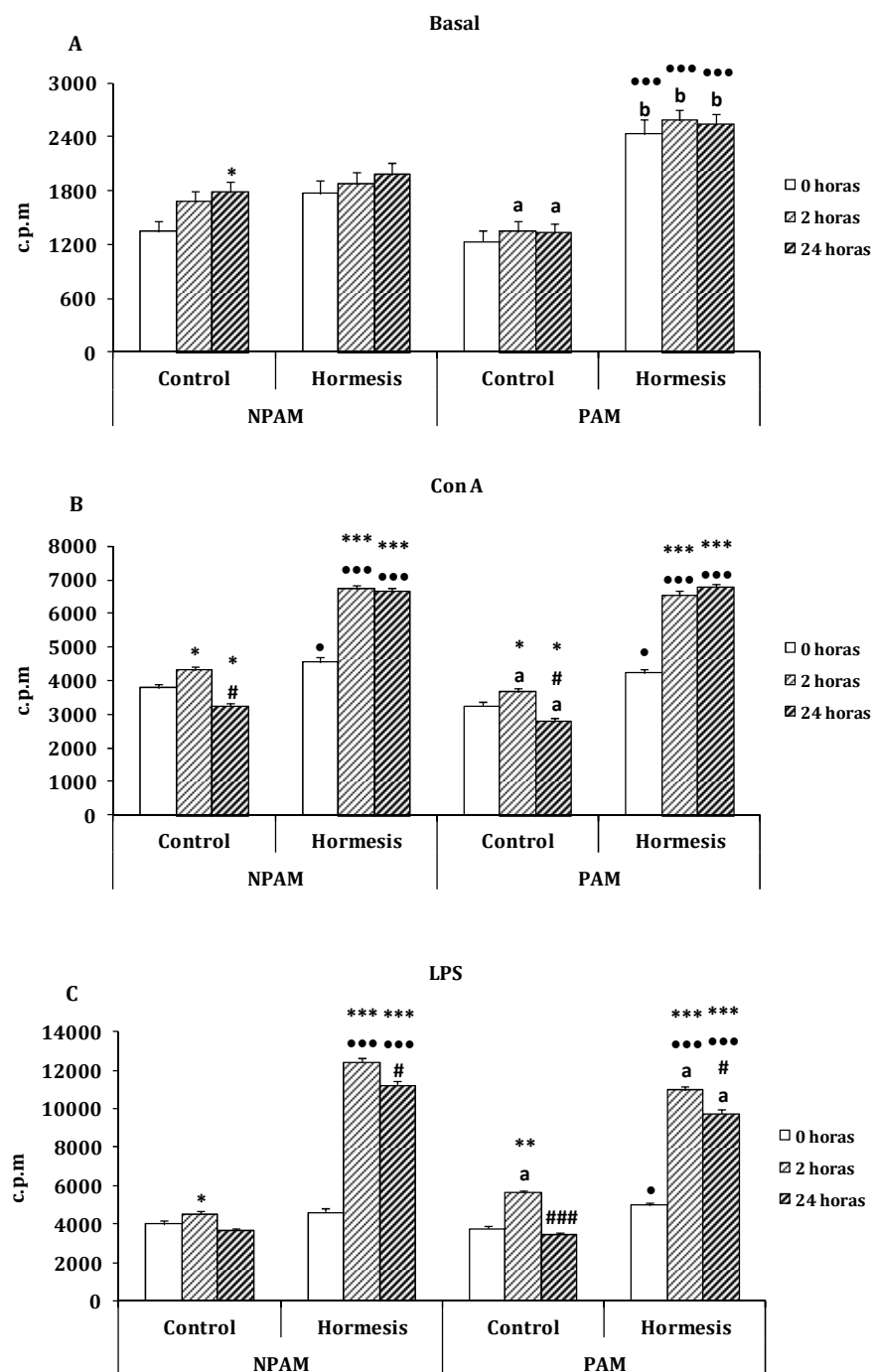
Las funciones analizadas en linfocitos han sido su capacidad de quimiotaxis y proliferación tanto basal como en respuesta a los mitógenos Con A y LPS (figuras 56 y 57 y tabla 25, respectivamente). Con respecto a la capacidad de quimiotaxis tras la administración de la endotoxina, se apreció un aumento significativo a las 2 y 24 horas en las viejas NPAM ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ ) y PAM

( $p<0,05$  y  $p<0,01$ ) con hormesis con relación a los valores obtenidos en tiempo inicial (0 horas). Además, mostraron mejores I.Q a las 0, 2 y 24 horas con respecto a sus controles. Por otro lado, al comparar los grupos de las viejas PAM con relación a las NPAM, se observó que las viejas PAM control y con hormesis tienen menores I.Q a las 0, 2 y 24 horas.



**Figura 56.** Índice de quimiotaxis (I.Q) de linfocitos peritoneales (número de macrófagos por filtro) procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las NPAM.

Los resultado de la *linfoproliferación* (figura 57 y tabla 25), en relación a la que tiene lugar a nivel basal (figura 57A), la administración de LPS la aumentó, respecto al tiempo 0 horas, a las 24 horas en viejas NPAM control ( $p<0,05$ ). Si se compara los resultados de los grupos con hormesis con relación a los controles, sólo se observó un aumento en viejas PAM con hormesis a las 0, 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ).



**Figura 57. Linfoproliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal) (A), y estimulados con concanavalina A (ConA) (B) y lipopolisacárido (LPS) (C), procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P<0,05$ , ###  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. <sup>a</sup> $P<0,05$ , <sup>b</sup> $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las NPAM.**

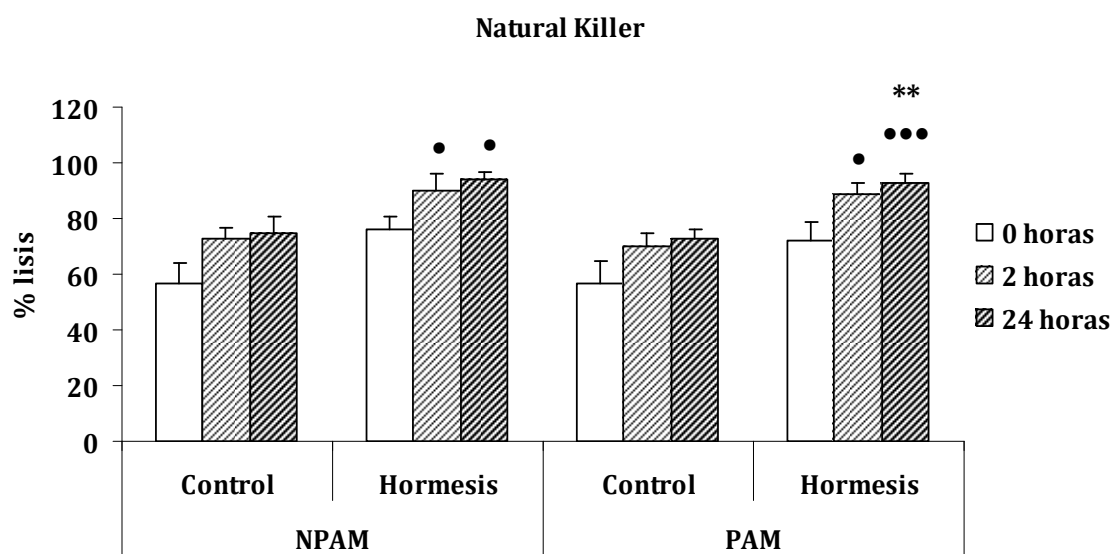
Al comparar los resultados obtenidos en las PAM con respecto a los NPAM, se mostró una disminución significativa en las viejas PAM control a las 2 y 24 horas ( $p<0,05$ ), mientras que las viejas PAM con hormesis mostraron un aumento a las 0, 2 y 24 horas ( $p<0,01$ ).

Los resultados obtenidos tras la estimulación por el mitógeno Con A (figura 57 B), se observó un aumento, con relación al tiempo 0 horas, a las 2 y 24 horas en viejas NPAM control ( $p<0,05$ ), viejas NPAM con hormesis ( $p<0,001$ ), viejas PAM control ( $p<0,05$ ) y viejas PAM con hormesis ( $p<0,001$ ), tras recibir la inoculación del LPS. Al comparar los resultados a las 24 horas con respecto a las 2 horas, se apreció una disminución en viejas NPAM y PAM control ( $p<0,05$ ). En lo que respecta a la comparación de los resultados obtenidos a los grupos con hormesis con los controles, se observó que a las 0, 2 y 24 horas un aumentos en viejas NPAM y PAM con hormesis. Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos de los grupos PAM tanto controles como homérticas con los NPAM, sólo se apreció una disminución significativa en las viejas PAM control a las 2 y 24 horas ( $p<0,05$ ). En cuanto a la linfoproliferación estimulada con LPS (figura 57 C), mostró un aumento significativo a las 2 horas en viejas NPAM control ( $p<0,05$ ) y en viejas PAM control ( $p<0,01$ ), y a las 2 y 24 horas en las viejas tanto NPAM y PAM con hormesis ( $p<0,001$ ) con respecto a las 0 horas. Si contrastamos las 24 horas con relación a las 2 horas, se observaron disminuciones en las viejas NPAM con hormesis ( $p<0,05$ ) y viejas PAM control ( $p<0,001$ ). Al comparar los grupos de hormesis con los controles, se apreció un aumento en las viejas NPAM y PAM a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ) y sólo a tiempo 0 horas en viejas con hormesis ( $p<0,05$ ). Al contrastar los resultados de los grupos PAM con relación a los NPAM, se mostró diferencias

significativas en viejas PAM control a las 2 horas y en viejas PAM con hormesis a las 2 y 24 horas ( $p<0,05$ ).

### Actividad natural killer

Los resultados de la actividad natural killer (NK) de los leucocitos peritoneales, se muestran en la figura 58 y la tabla 25. El efecto del shock endotóxico a las 2 y 24 horas, supuso un aumento de la actividad NK en todos los grupos, sin embargo sólo se observó una diferencia significativa a las 24 horas en las viejas PAM con hormesis ( $p<0,01$ ) con respecto al tiempo inicial (0 h). En cuanto a los resultados obtenidos con respecto a los controles, se apreció un aumento significativo a las 2 y 24 horas en los grupos que recibieron la hormetina (NPAM  $p<0,05$  y PAM  $p<0,05$  y  $p<0,001$ ).

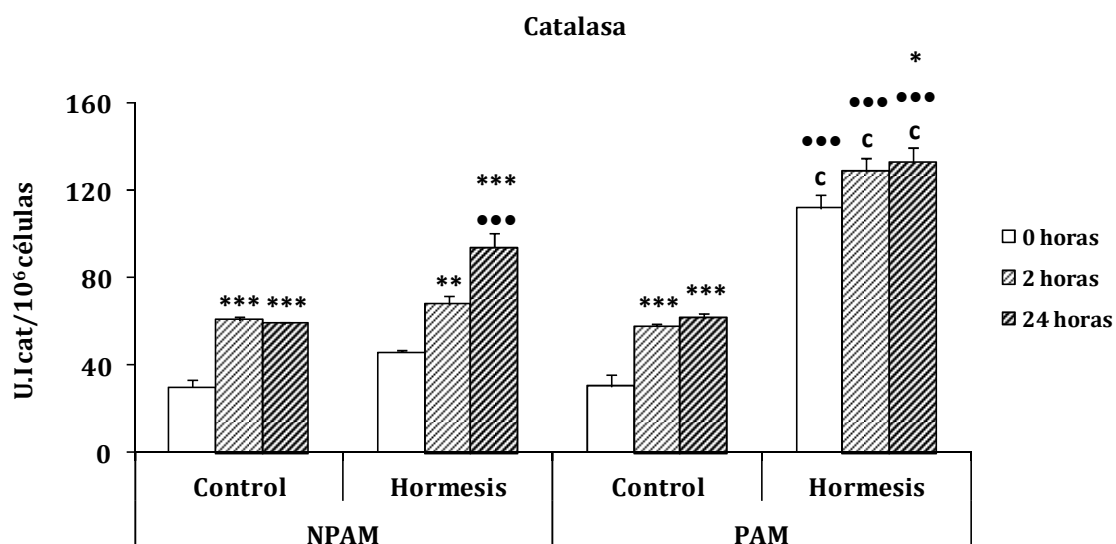


**Figura 58. Actividad natural killer (% lisis) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*  $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. •  $P<0,05$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control.

## Parámetros de estrés oxidativo

### Defensas antioxidantes

Los resultados de las defensas antioxidantes de la actividad enzimática catalasa (CAT) y glutatión reducido (GHS), se recogen en las 59 y 60 y en la tabla 25. En la actividad de la enzima catalasa, se apreció aumentos significativos en todos los grupos tras recibir la endotoxina a las 2 y 24 horas (excepto en las viejas con hormesis que sólo fue a las 24 horas).

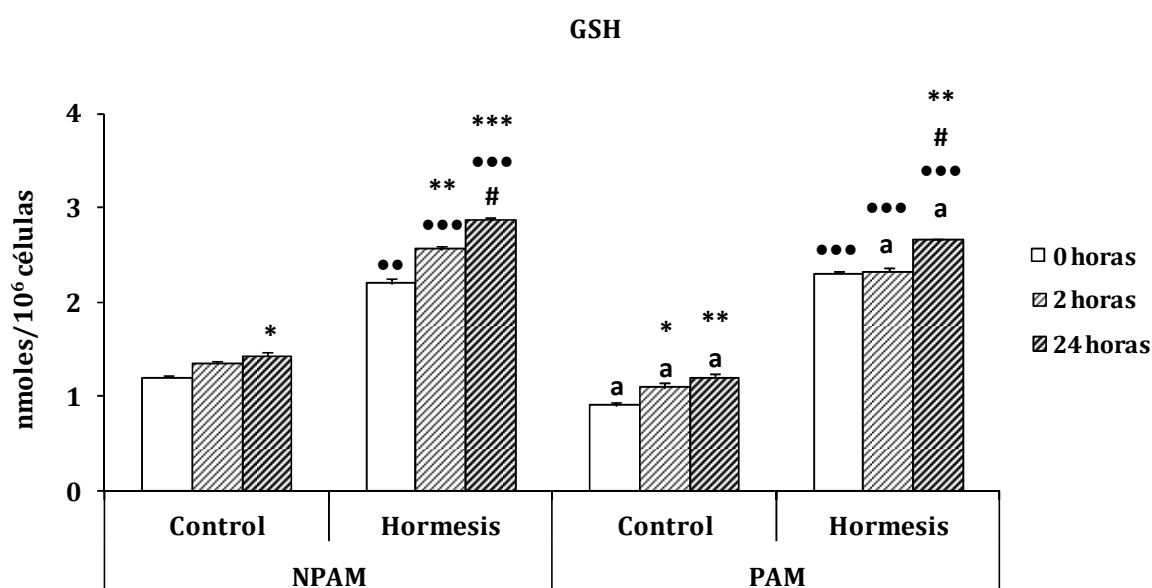


**Figura 59.** Actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) (Ucat/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ●●● $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. c  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo NPAM.

Al comparar los resultados obtenidos con los grupos controles, se observó un aumento de la actividad de esta enzima a las 24 horas en las viejas NPAM y a las 2 y 24 horas en viejas PAM con hormesis ( $p < 0,001$ ). Si contrastamos los grupos PAM con relación NPAM, se apreció un aumento significativo a las 0, 2 y 24 horas

en las viejas PAM con hormesis con relación a las viejas NPAM con hormesis ( $p<0,001$ ).

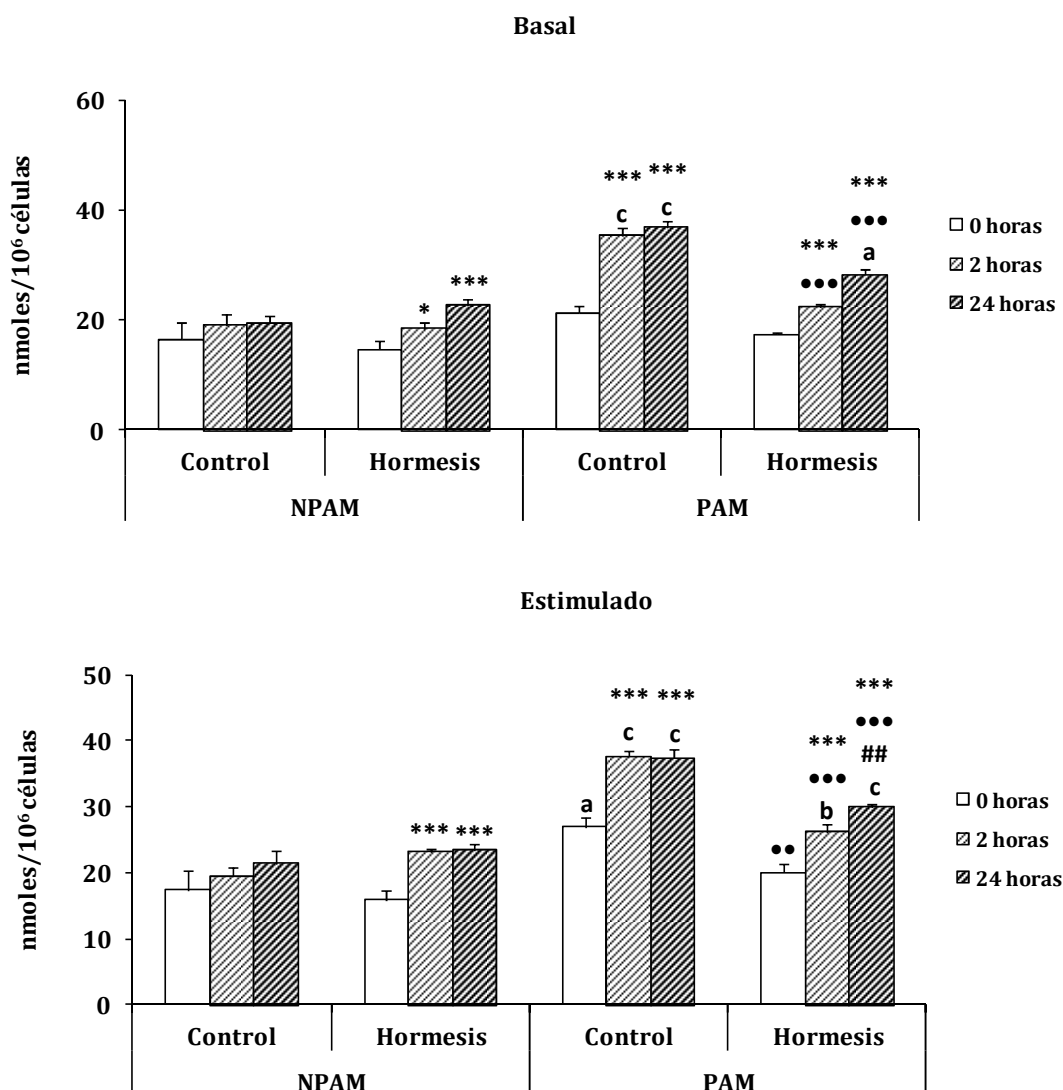
Con relación a los resultados obtenidos del contenido del GSH (figura 60), se observó aumentos significativos a las 2 y 24 horas en las viejas NPAM con hormesis ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ ) y en la viejas PAM control ( $p<0,05$  y  $p<0,01$ ) con respecto a las 0 horas. En comparación con los grupos controles, se apreció un aumento significativo a las 0, 2 y 24 horas en las viejas NPAM y PAM con hormesis. Cuando se analizaron los resultados obtenidos de los niveles de GSH, entre los grupos que recibieron PAM y los NAPM, se observaron disminuciones significativas de este antioxidante con el shock endotóxico a las 0, 2 y 24 horas en viejas PAM control y a las 2 y 24 horas viejas PAM con hormesis ( $p<0,05$ ).



**Figura 60. Actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) (Ucat/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. c  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo NPAM.**

Compuestos oxidantes

En la figura 61 y 62 y tabla 25 se representan los niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) de leucocitos peritoneales, tanto liberado en condiciones basales como en estimulación con látex y la actividad xantina oxidasa.



**Figura 61.** Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  cels) basal y bajo la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo NPAM.

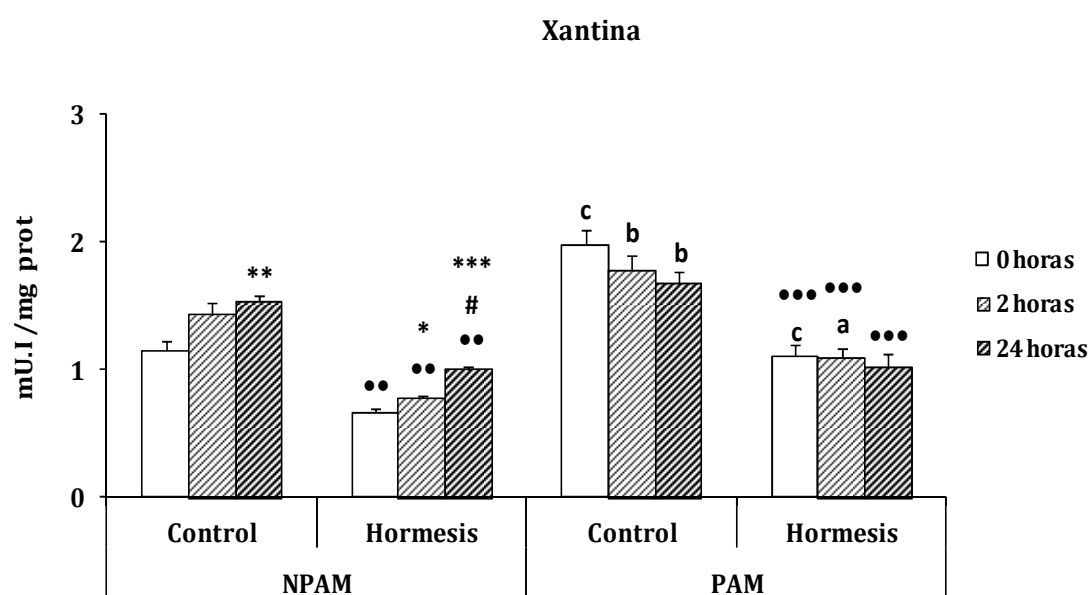


En estado basal se observaron aumentos a las 2 y 24 horas, en todos los grupos con respecto a las 0 horas (excepto las viejas NPAM control). Comparando los resultados con los grupos controles, se apreció una disminución en viejas PAM con hormesis a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ). En relación a las viejas NPAM, se dieron aumentos en viejas PAM control a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ) y en viejas PAM con hormesis a las 24 horas ( $p<0,05$ ).

Tras la estimulación con látex, los valores aumentaron tras la administración del LPS, en viejas NPAM con hormesis y en viejas PAM tanto control como horméticas a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ). En cuanto a los resultados obtenidos en los grupos con hormesis con relación a los controles, sólo se observó aumentos significativos a las 0, 2 y 24 horas en las viejas PAM con hormesis. Al comparar con los NPAM, se mostró aumentos en las viejas PAM control a las 0, 2 y 24 horas y en viejas PAM con hormesis a las 2 y 24 horas ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ ). Si comparamos los resultados obtenidos tras la estimulación con látex con respecto al estado basal, se apreció tendencias al aumento en todos los grupos analizados, sin embargo sólo se observaron diferencias significativas a las 0 horas en las viejas PAM control ( $p<0,05$ ) y en viejas PAM con hormesis a las 2 horas ( $p<0,05$ ) (tabla 25).

En la actividad xantina oxidasa (figura 62), se observó que tras la administración con el LPS aumentos en viejas NPAM control a las 24 horas ( $p<0,01$ ) y en las viejas PAM con hormesis a las 2 y 24 horas ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ ) con respecto al tiempo inicial (0 horas). Con relación a las 24 horas, sólo se observó un aumento en las viejas NPAM con hormesis ( $p<0,05$ ) con respecto a las 2 horas. Al comparar los resultados obtenidos de los grupos con hormesis con

respecto a sus correspondientes controles, se mostró disminuciones significativas tanto en las viejas NPAM y PAM con hormesis a las 0, 2 y 24 horas ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ , respectivamente). Con relación a los resultados de las viejas PAM tanto control como con hormesis, se observaron incrementos significativos (a las 0, 2 y 24 horas en PAM control, y a las 0 y 2 horas en PAM con hormesis) con respecto a los grupos NPAM.



**Figura 62. Actividad xantina oxidasa (XO) (mU.I./mg prot) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo NPAM.

## Resultados

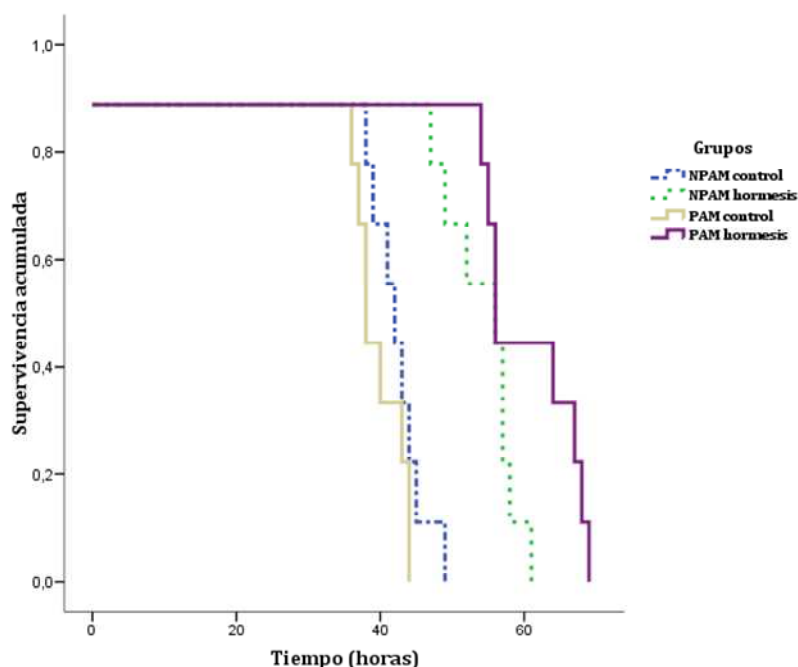
**Tabla 25.** Parámetros de función inmunitaria y estado redox de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de 50 mg/Kg de LPS.

Parámetros	Unidades	NPAM Control			NPAM Hormesis			PAM Control			PAM Hormesis		
Función inmunitaria		0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas
Quimiotaxis de macrófagos	I.Q	562±10	557±9	564±8	543±11	652±8***	654±9***	365±10c	345±11c	356±9c	356±11	465±7***b	476±10***b
Fagocitosis de macrófagos													
Índice de fagocitosis	I.F	776±42	835±21	885±32	871±34	1013±67	1038±64	686±43	811±47	847±27	972±16•	1049±21*•	1099±34*•
Eficacia fagocítica	E.F	82±6	78±5	75±5	77±6	86±6	89±4	86±3	94±3a	77±6#	92±4a	94±4	89±5•
Anión superóxido intracelular nmoles/10 <sup>6</sup> cél													
Basal		53,81±1,1	61,00±1,2*	152,00±3,32***###	77,32±6,1•	79,80±4,5•	89,29±3,4***	16,65±3,3c	28,15±3,4*c	39,69±1,23***c	77,00±4,3***	118,65±3,4***c	152,00±6,3***###c
Estimulado		57,21±2,13	64,34±2,32	175,00±3,4***### <sup>1</sup>	80,07±4,5***	84,07±3,4***	91,04±4,5***	27,65±3,4c	30,74±2,4c	49,37±3,2c	84,81±4,5***	125,00±2,4***c	175,00±4,5***###c <sup>1</sup>
Quimiotaxis de linfocitos	I.Q	465±14	478±11	487±12	678±11***	754±17***	797±13***	310±11a	324±12a	332±12a	543±12***a	567±11***b	589±9***b
Linfoproliferación	Basal	c.p.m	1345±119	1678±123	1786±111*	1765±147	1876±135	1978±138	1234±116	1345±121a	1326±110a	2435±154***b	2587±112***b
	ConA	c.p.m	3785±107 <sup>2</sup>	4321±113* <sup>2</sup>	3245±105* <sup>2</sup>	4563±132* <sup>2</sup>	6734±108*** <sup>3</sup>	6654±107*** <sup>3</sup>	3241±143 <sup>2</sup>	3665±112*a <sup>2</sup>	2765±109* <sup>2</sup>	4234±112* <sup>1</sup>	6543±143*** <sup>2</sup>
	LPS	c.p.m	3987±124 <sup>2</sup>	4536±121* <sup>2</sup>	3678±124 <sup>2</sup>	4611±187 <sup>2</sup>	12435±217*** <sup>3</sup>	11241±234*** <sup>3</sup>	3765±109 <sup>2</sup>	5678±98*a <sup>2</sup>	3487±97### <sup>2</sup>	4987±134* <sup>1</sup>	10976±212*** <sup>3</sup>
Actividad natural killer (NK)	% lisis	57±7	73±4	75±6	76±5	90±6•	94±3•	57±8	70±5	73±3	72±7	89±4•	93±3***
Estado redox													
Antioxidantes													
Catalasa (CAT)	U.l cat/10 <sup>6</sup> cél	30,29±3,01	60,95±1,1***	59,23±0,99***	46,21±1,02	68,13±4,2**	94,27±6,2***	30,75±5,2	58,38±1,2***	62,40±1,5***	112,00±6,2***c	129,00±6,3***c	133,00±7,2***c
Glutation (GSH)	nmoles/10 <sup>6</sup> cél	1,2±0,03	1,35±0,02	1,43±0,04*	2,2±0,05•	2,56±0,03***	2,87±0,02***#	0,91±0,02a	1,1±0,05*a	1,2±0,04*a	2,3±0,03***	2,32±0,05***a	2,65±0,02***#a
Compuestos oxidantes													
Anión superóxido extracelular nmoles/10 <sup>6</sup> cél													
Basal		16,54±3,1	19,02±2,1	19,44±1,2	14,67±1,5	18,47±1,1*	22,66±1,02***	21,38±1,3	35,25±1,4***c	36,82±1,3***c	17,34±0,34	22,30±0,56***	28,26±0,95***a
Estimulado		17,35±3,11	19,53±1,21	21,34±2,11	15,92±1,31	23,12±0,45***	23,33±1,12***	27,00±1,41a <sup>1</sup>	37,60±0,98***c	37,40±1,23***c	20,00±1,40•	26,24±1,21***b <sup>1</sup>	30,00±0,45***###c
Xantina oxidasa (XO)		1,15±0,08	1,43±0,09	1,54±0,04**	0,66±0,03•	0,78±0,01•	1,00±0,03***#	1,98±0,11c	1,78±0,12b	1,67±0,10b	1,11±0,09***c	1,09±0,08***a	1,02±0,10***

Cada dato representa la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ### $P < 0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •• $P < 0,01$ , ••• $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo control. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor al grupo NPAM. 1 $P < 0,05$ , 2 $P < 0,01$ , 3 $P < 0,001$  con respecto a la condición basal (capacidad digestiva celular, anión superóxido extracelular y la linfoproliferación).

Supervivencia

En la figura 63 se representa *la supervivencia* de las ratonas hembras ICR-CD1 PAM y NPAM control y con hormesis tras la administración de la dosis de LPS (50 mg/kg). Se observó, que el grupo de hembras NPAM control tuvo una supervivencia mínima y máxima de 28 y 47 horas, respectivamente, con una supervivencia media de  $38 \pm 5$  horas, mientras las hembras NPAM con hormesis mostraron una supervivencia mínima y máxima de 36 y 61 horas con una media de  $48 \pm 6$  horas. La supervivencia mínima y máxima de los grupos de hembras PAM tanto control como horméticas fue de 26 y 45 con una media de  $36 \pm 5$  horas, y de 40 y 68 horas con una media de  $54 \pm 7$  horas, respectivamente. El test de *Kaplan-Meier* revela diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Log Rank [Mantel-Cox]= 0,0032).



**Figura 63.** Curvas de supervivencia en horas, tras la inducción de un shock endotóxico (50mg/kg) de ratonas ICR/CD1 viejas NPAM y PAM. Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada uno de los grupos experimentales.

**4.4. Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico.**

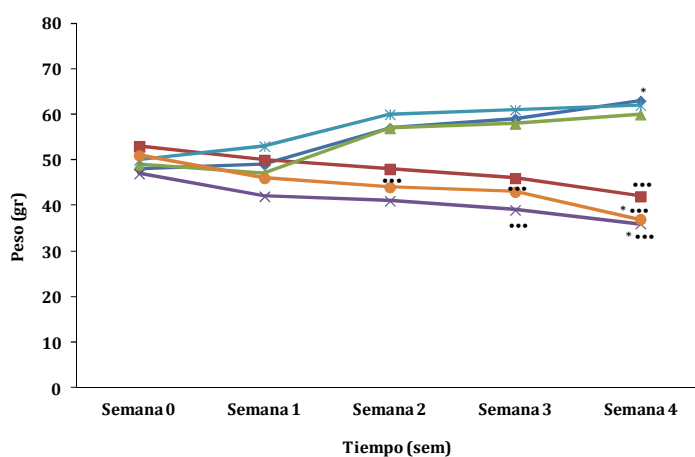
Se expondrán los resultados correspondientes al efecto de una dieta enriquecida con antioxidantes tiólicos (NAC y TP) en diversos parámetros funcionales y de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1, a tres edades diferentes: adultas ( $30 \pm 2$  semanas de edad), viejas ( $80 \pm 2$  semanas de edad) y longevas ( $126 \pm 2$  semanas de edad), así como la supervivencia de los animales tras la administración de 50 mg/kg de LPS de *E.coli*. En todos los casos los datos se han recogido a las 0 horas antes de la administración del LPS, y a las 2 y 24 horas tras su inoculación vía intraperitoneal. Los resultados se indican en las figuras de la 64 a la 76 y en las tablas de la 26 a la 38. Los resultados se han agrupado con el siguiente orden: en primer lugar, los correspondientes al peso corporal e ingesta de la dieta control y con antioxidantes (NAC y TP) de los grupos analizados, seguidamente de los resultados correspondientes a los parámetros función y de estrés oxidativo.

En la representación gráfica de los resultados se muestran las diferencias estadísticas en relación a los grupos con dieta normal con respecto a los que recibieron la dieta rica en antioxidantes, a las 0 horas (referencia del estado basal de los leucocitos peritoneales) y de los valores obtenidos a las 2 y 24 horas tras el shock endotóxico. Además, se indican las diferencias estadísticas con respecto a la edad adulta (edad de referencia del mejor estado inmunológico) de los valores encontrados a las otras edades estudiadas. Por otro lado, en las tablas se muestran

las diferencias estadísticas obtenidas en cada parámetro, tras la administración del LPS, con el correspondiente en el grupo control que recibió PBS.

#### 4.4.1. Peso corporal e ingesta de las dietas

En la figura 64 y tabla 26 se representa los resultados obtenidos del peso corporal de las ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas que ingirieron tanto la dieta control como la suplementada con antioxidantes tiólicos (NAC y TP). Se observó un aumento progresivo del peso en todos los grupos de edad con dieta control, con diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la cuarta semana con relación a la primera semana. Por el contrario, los grupos que recibieron la dieta enriquecida con los antioxidantes tiólicos muestran una disminución del peso. Al comparar los grupos con dieta suplementada con antioxidantes con respecto a los controles, revela diferencias significativas en adultas, viejas y longevas ( $p<0,001$ ).



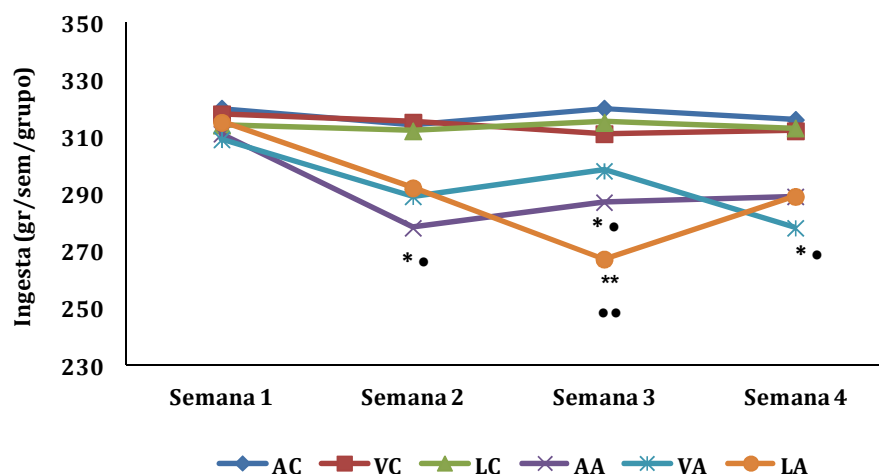
**Figura 64. Peso corporal (gramos) de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas de ingesta.** Cada punto representa la media de los valores obtenidos del número de animales en cada edad. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo control. \* $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a la semana 1.

**Tabla 26.** Peso corporal (gramos) de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, con dieta control y suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de N-acetilcisteína (NAC) y 0,1 % de tioprolina (TP)) durante cuatro semanas de ingesta.

Dietas	Grupos	Tiempo (semanas)				
	Experimentales (Edad)	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Dieta control	Adultas	48±4	49±4	57±3	59±3	63±3*
	Viejas	49±4	47±4	57±2	58±2	60±2*
	Longevas	50±2	53±4	60±2	61±2	62±2*
Dieta con Ax	Adultas	53±2	50±2	48±1	46±1	42±2***
	Viejas	47±3	42±3	41±2	39±2***	36±2***
	Longevas	51±2	46±1	44±1***	43±2***	37±1***

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de los pesos. \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo control. \* $P < 0,05$  con respecto al correspondiente valor a la semana 1. Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

En la figura 65 y tabla 27 se recogen los resultados obtenidos de la ingesta por semana de la dieta control y suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% NAC + 0,1% TP) en ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas. En la ingesta de la dieta control no se observan grandes cambios a lo largo de las cuatro semanas en los distintos grupos de edad. Por el contrario, hay una menor ingesta de la dieta suplementada en todos los grupos de edad. La comparación entre los ratones controles y suplementados mostró diferencias significativas en las adultas en la segunda y tercera semana ( $p < 0,05$ ), viejas a la cuarta semana ( $p < 0,05$ ) y longevas a la tercera semana ( $p < 0,01$ ).



**Figura 65. Ingesta (gramos) de dietas control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas por ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas.** Cada punto representa la media de los valores obtenidos del número de animales en cada edad. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor del grupo control. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a la semana 1.

**Tabla 27. Ingesta (gramos) de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, con dieta control y suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de N-acetilcisteína (NAC) y 0,1 % de tioprolina (TP)) durante cuatro semanas.**

Dietas	Grupos	Tiempo (semanas)			
	Experimentales (Edad)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Dieta control	Adultas	320	314	320	316
	Viejas	318	315	311	312
	Longevas	314	312	315	313
Dieta con Ax	Adultas	311	278*•	287*•	289
	Viejas	309	289	298	278*•
	Longevas	315	292	267**••	289

Se muestra la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de los pesos. • $P<0,01$ , •• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del grupo control. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a la semana 1. Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).



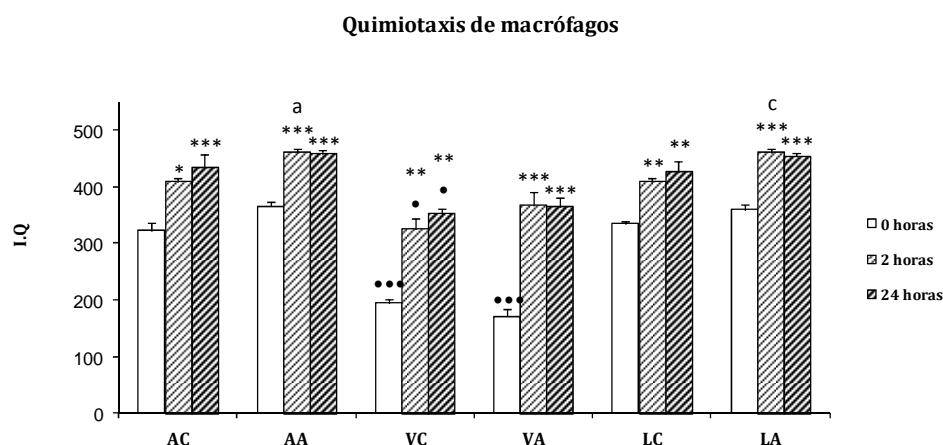
**4.4.2. Estudio de la función inmunitaria****Función de macrófagos**

Se han analizado las funciones propias de los macrófagos, como la migración hacia el foco infeccioso (quimiotaxis), la ingestión de agentes extraños (fagocitosis) y su posterior digestión mediante la producción de radicales libres como el anión superóxido.

En la figura 66 y tabla 28 se recogen los datos obtenidos en relación al *índice de quimiotaxis* (I.Q) de macrófagos peritoneales a las diferentes edades analizadas. En este parámetro se observó un aumento en ( $p<0,05$ ) adultas y ( $p<0,001$ ) longevas suplementadas con antioxidantes a las 2 horas tras la administración del LPS, con relación a sus correspondientes controles de dieta. Con respecto a las 0 horas, se observó un incremento significativo en todos los grupos de edad tanto con dieta control como suplementada a las 2 y 24 horas. Comparando con las adultas, las viejas con dieta control presentaron una disminución del I.Q a las 0 (estado previo a la administración del LPS) ( $p<0,001$ ), 2 y 24 horas ( $p<0,05$ ), mientras que sólo se observó a las 0 horas en viejas con dieta suplementada ( $p<0,001$ ).

En relación a las comparaciones obtenidas de los grupos con shock endotóxico y sus correspondientes grupos controles (que recibieron PBS) (tabla 28), se observó que las adultas, viejas y longevas con dieta control y suplementada, mostraron aumentos estadísticamente significativos a las 2 y 24 horas ( $p<0,05$  y  $p<0,01$  a las 2 y 24 h en adultas y longevas con dieta control y adultas con dieta

suplementada y  $p<0,001$  en viejas con dieta control y suplementada, y en longevas con dieta suplementada).



**Figura 66. Índice de quimiotaxis (I.Q.) de macrófagos peritoneales (número de macrófagos por filtro) de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. • $P<0,05$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.

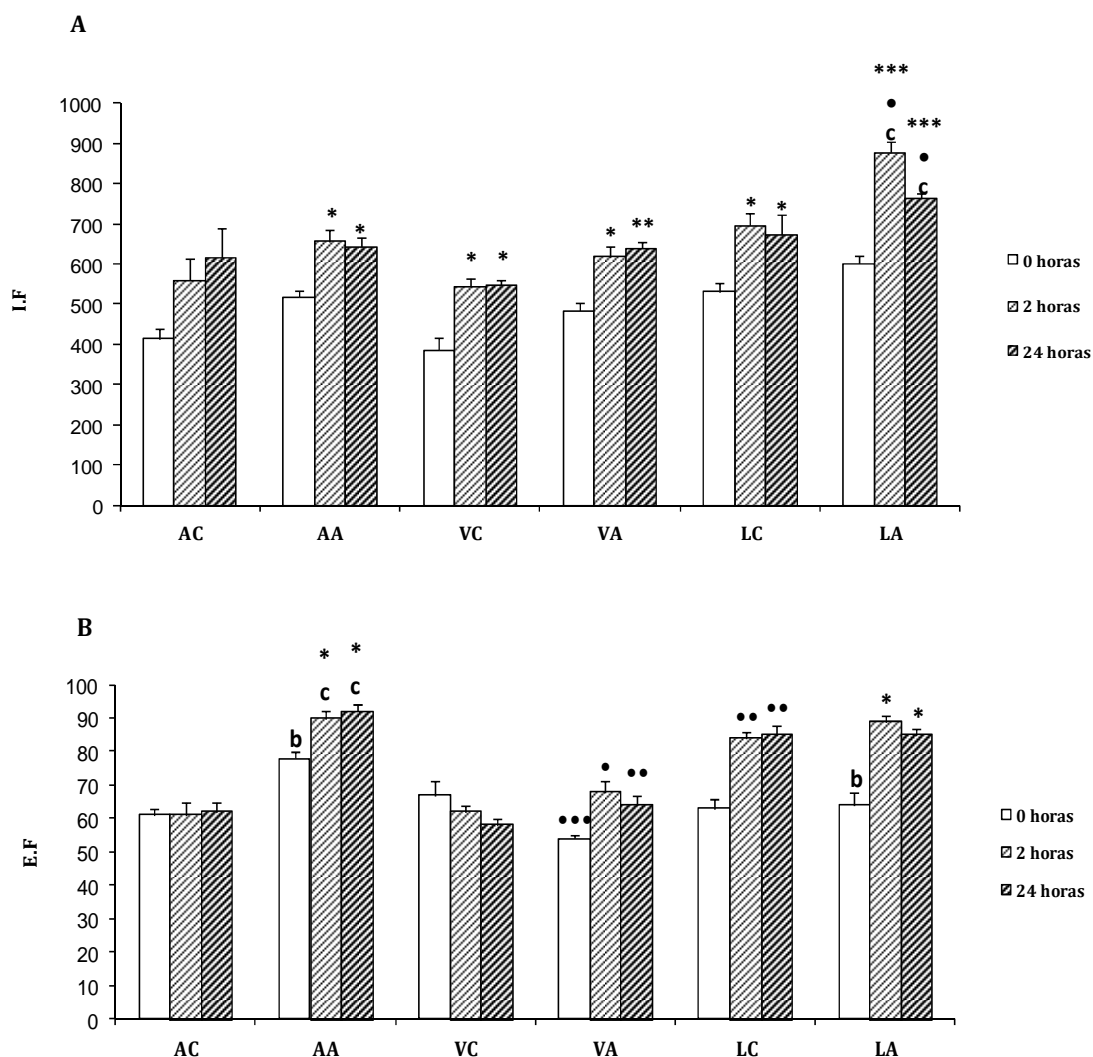
En relación a la *fagocitosis*, los resultados de índice y eficacia fagocítica se muestran en figura 67A y tabla 29 y en figura 67B y tabla 30, respectivamente. Se observó con respecto a los controles (dieta normal), una elevación significativa ( $p<0,001$ ) a las 2 y 24 horas del índice fagocítico en longevas, y en la eficacia fagocítica las adultas y longevas presentaron una disminución ( $p<0,01$ ) a las 0 horas y solo se observaron incrementos ( $p<0,001$ ) a las 2 y 24 horas en adultas. Al comparar con respecto al valor obtenido en estado basal (0 horas), se apreció una elevación significativa de estas funciones a las 2 y 24 horas, en todas las edades.

**Tabla 28.** Índice de quimiotaxis (I.Q) (número de macrófagos por filtro), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Quimiotaxis de macrófagos (I.Q)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	323±14	408±7* <sup>1</sup>	434±23*** <sup>1</sup>
	Ax	366±8	459±8*** <sup>a2</sup>	458±7*** <sup>2</sup>
Viejas	Control	195±6***	325±20** <sup>•3</sup>	353±7** <sup>•3</sup>
	Ax	171±12***	367±23*** <sup>3</sup>	364±17*** <sup>3</sup>
Longevas	Control	335±5	408±7** <sup>1</sup>	425±21** <sup>2</sup>
	Ax	359±10	460±8*** <sup>c3</sup>	454±5*** <sup>3</sup>
Adultas	(PBS)	343±21	321±14	314±11
Viejas		200±17	198±12	187±21
Longevas		326±18	321±11	317±13

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control. <sup>1</sup> $P<0,05$ , <sup>2</sup> $P<0,01$ , <sup>3</sup> $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

A las 24 horas con relación a las 2 horas, no se observaron diferencias significativas. En comparación con las adultas, se dio una disminución de la E.F en viejas a las 0, 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ,  $p<0,05$ ,  $p<0,001$ , respectivamente) y en longevas aumentos tanto en la E.F como en el I.F a las 2 y 24 horas ( $p<0,01$ ). Cuando comparamos los resultados para el índice fagocítico, entre los grupos que recibieron el LPS y sus respectivos controles (PBS) (tabla 29), se observó un aumento a las 2 y 24 horas en adultas ( $p<0,01$ ), viejas ( $p<0,01$  control LPS,  $p<0,001$  Ax LPS) y longevas ( $p<0,05$  control LPS,  $p<0,001$  Ax LPS). En cuanto a la eficacia fagocítica (tabla 30), se apreció un aumento a las 2 y 24 horas en adultas ( $p<0,001$  Ax LPS), viejas ( $p<0,05$  Ax LPS) y en longevas ( $p<0,01$  control LPS, 2  $p<0,001$  y 24 h  $p<0,01$  Ax LPS).



**Figura 67.** Índice de fagocitosis (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos) (A) y eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos) (B), de macrófagos peritoneales de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.

**Tabla 29.** Índice fagocítico (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en

situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Índice fagocítico (I.F)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	413±25	561±51	616±73 <sup>2</sup>
	Ax	518±14	656±30 <sup>*2</sup>	643±24 <sup>*2</sup>
Viejas	Control	386±31	544±20 <sup>*1</sup>	549±11 <sup>*1</sup>
	Ax	484±21	618±26 <sup>*3</sup>	638±17 <sup>**3</sup>
Longevas	Control	531±23	696±32 <sup>*1</sup>	673±48 <sup>*1</sup>
	Ax	601±18	878±27 <sup>***•c3</sup>	765±11 <sup>***•c3</sup>
Adultas	Control	424±12	436±10	439±15
Viejas	(PBS)	367±24	387±21	398±18
Longevas		501±22	489±21	476±15

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. • $P < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en adultas. c  $P < 0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control. <sup>1</sup> $P < 0,05$ , <sup>2</sup> $P < 0,01$ , <sup>3</sup> $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

Los resultados correspondientes a los niveles intracelulares de *anión superóxido* ( $O_2^-$ ) (nmol/ $10^6$  células), se muestran en la figura 68 y la tabla 31. Se observó un aumento significativo en todos los grupos de edad con dieta rica en antioxidantes en relación con los que recibieron la dieta control. Cuando se comparan los valores en relación a los obtenidos en las adultas con dieta control, se observó que a tiempo 0, 2 y 24 h, hay diferencias significativas entre las edades en el  $O_2^-$  basal y estimulado (con excepción a las 2 horas en longevas en el estado estimulado). Al comparar con las adultas con dieta suplementada, se observó una disminución en viejas del  $O_2^-$  basal como estimulado, y en longevas (estado basal), mientras que en longevas los niveles de aniión superóxido estimulado mostró un aumento. Por otro lado, a las 2 y 24 horas, en general, tras la administración de la endotoxina se da un aumento significativo de estos niveles, tanto en basales como

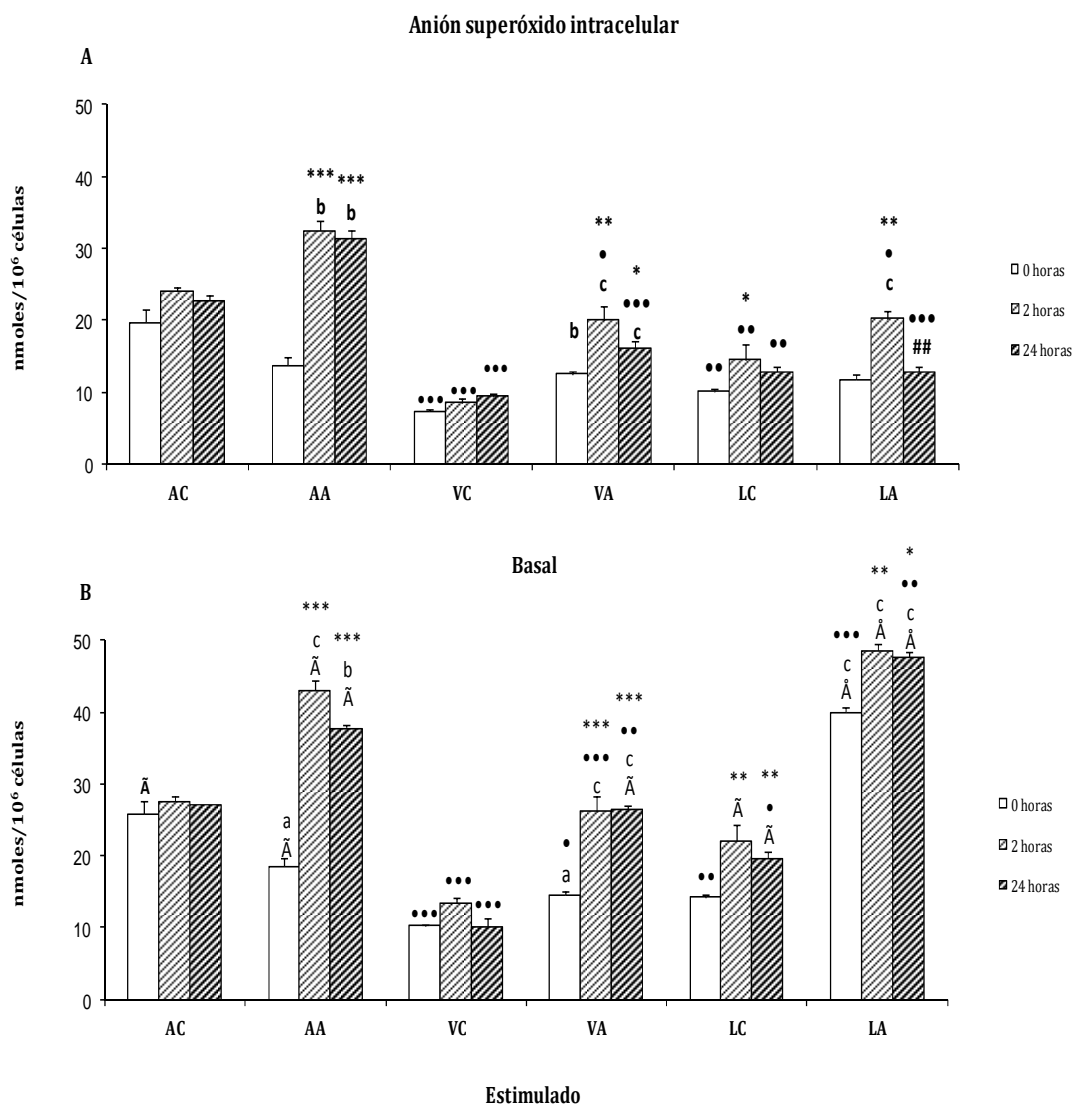
en la estimulada (con excepción en viejas y adultas con dieta control) con respecto al tiempo inicial 0 h. Los valores a 24 horas con respecto a las de 2 horas sólo en longevas con dieta suplementada con antioxidantes, en los valores basales, se apreció una disminución ( $p<0,01$ ).

**Tabla 30.** Eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Eficacia fagocítica (E.F)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	61±2	61±4	62±3
	Ax	78±2b	90±2*c <sup>3</sup>	92±2*c <sup>3</sup>
Viejas	Control	67±4	62±2	58±2
	Ax	54±1•••	68±3• <sup>1</sup>	64±3•• <sup>1</sup>
Longevas	Control	63±3	84±2•• <sup>2</sup>	85±3•• <sup>2</sup>
	Ax	64±4b	89±2* <sup>3</sup>	85±2* <sup>2</sup>
Adultas	Control (PBS)	60±3	61±1	62±1
Viejas		56±4	51±4	52±3
Longevas		68±1	62±2	66±2

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control. <sup>1</sup> $P<0,05$ , <sup>2</sup> $P<0,01$ , <sup>3</sup> $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

Al comparar el estado basal con el estimulado, se observaron elevaciones significativas en todos los grupos de edad (con excepción de las 2 y 24 horas en adultas, en viejas a todas las horas y a las 2 horas en longevas con dieta control). Cuando comparamos los resultados obtenidos con respecto a los grupos con PBS (tabla 31), se observaron aumentos significativos de los niveles del  $O_2^-$ , en las todas las edades que recibieron la dieta suplementada en el estado basal y estimulado, y sólo en el estado estimulado en los grupos con dieta control.



**Figura 68. Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal (A) y bajo la estimulación con partículas de látex (B) de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control. Ñ  $P<0,05$ , Å  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del estado basal.**

**Tabla 31.** Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^-$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y tras la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

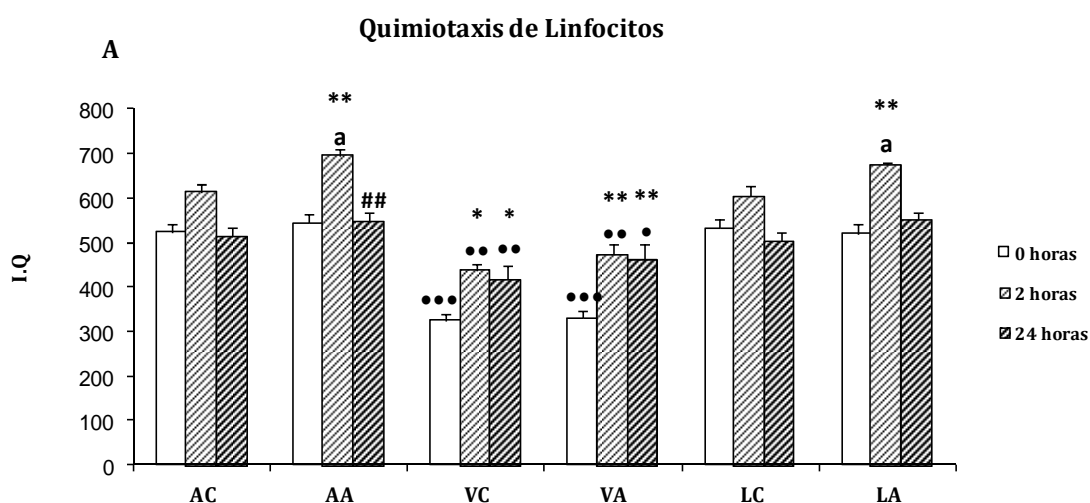
Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Anión superóxido intracelular (nmol/ $10^6$ células)					
		Basal			Estimulado		
		Tiempo (horas)			Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	19,7±1,9	24,1±0,6	22,8±0,6	25,8±1,3 $\tilde{A}$	27,6±1,2 <sup>1</sup>	27,1±1,5 $\tilde{A}$ <sup>1</sup>
	Ax	13,7±1,2a <sup>3</sup>	32,5±1,3**b <sup>2</sup>	31,3±1,7**b <sup>2</sup>	18,5±1,2a $\tilde{A}$ <sup>1</sup>	43,1±1,4***c $\tilde{A}$ <sup>3</sup>	37,7±2,0***b $\tilde{A}$ <sup>3</sup>
Viejas	Control	7,3±0,3•••	8,5±0,6•••	9,4±0,5•••	10,2±0,7•••	13,5±0,5••• <sup>1</sup>	10,1±0,5•••
	Ax	12,5±0,5b	20,0±2,0**•c <sup>3</sup>	16,2±0,9*•••c <sup>3</sup>	14,5±0,6•a <sup>1</sup>	26,2±1,2***•••c <sup>3</sup>	26,5±1,3***••c $\tilde{A}$ <sup>3</sup>
Longevas	Control	10,1±0,4••	14,5±2,2*••	12,8±0,7••	14,2±0,6••	22,1±1,8** $\tilde{A}$ <sup>2</sup>	19,7±1,4**• $\tilde{A}$ <sup>2</sup>
	Ax	11,7±0,7	20,2±1,0**•c <sup>3</sup>	12,8±0,8•••##	40,0±1,8•••c $\tilde{A}$ <sup>3</sup>	48,6±1,2*c $\tilde{A}$ <sup>3</sup>	47,7±1,3*••c $\tilde{A}$ <sup>3</sup>
Adultas	Control (PBS)	20±1,2	22±2,1	20±1,1	24,2±2,4	23,1±1,5	22,4±1,3
Viejas		9,9±1,1	8,3±1,2	8,0±1,2	10,2±1,3	10,1±1,2	12,2±1,2 $\tilde{A}$
Longevas		11,2±1,1	12,1±1,2	11±1,0	15,2±1,2 $\tilde{A}$	14,2±1,1 $\tilde{A}$	15,1±1,1 $\tilde{A}$

Cada dato es la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P < 0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •  $P < 0,05$ , ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.  $\tilde{A}$   $P < 0,05$ ,  $\tilde{A}$   $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor del estado basal. <sup>1</sup> $P < 0,05$ , <sup>2</sup> $P < 0,01$ , <sup>3</sup> $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).



### Función de los linfocitos

En las figuras 69 y 70 y las tablas 32 y 33, se muestran las funciones analizadas en linfocitos como su capacidad de migración a un foco antigénico (quimiotaxis), así como la proliferación tanto basal como en respuesta a los mitógenos Con A y LPS.



**Figura 69. Índice de quimiotaxis (I.Q.) de linfocitos peritoneales (número de macrófagos por filtro) de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.

En los resultados de la capacidad de quimiotaxis de linfocitos (figura 69), se observó un aumento significativo ( $p<0,05$ ) a las 2 horas en adultas y longevas con dieta suplementada en relación a sus controles de dieta. Si comparamos con el tiempo inicial (0 horas) se apreció aumentos en todos los grupos de edad, sin

embargo, las diferencias significativas se observaron en las adultas y longevas (con dieta suplementada) a las 2 horas ( $p<0,001$ ) y a las 2 y 24 horas en viejas con dieta control ( $p<0,05$ ) y suplementada ( $p<0,01$ ). En comparación de las 24 horas con relación a las 2 horas, sólo se observó una disminución significativa ( $p<0,01$ ) en adultas con dieta rica de antioxidantes.

**Tabla 32.** Índice de quimiotaxis (I.Q) (número de linfocitos por filtro), de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Quimiotaxis de linfocitos (I.Q)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	524±18	613±19	514±18
	Ax	545±18	696±13**a <sup>1</sup>	547±19##
Viejas	Control	325±15•••	438±13*••	416±31*•
	Ax	331±16•••	473±24**•• <sup>2</sup>	460±37**•• <sup>2</sup>
Longevas	Control	532±19	604±23	504±18
	Ax	520±21	676±4**a <sup>1</sup>	551±18
Adultas	Control (PBS)	511±16	529±21	514±22
Viejas		350±16	345±19	365±15
Longevas		544±16	532±11	546±17

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control. <sup>1</sup> $P<0,05$ , <sup>2</sup> $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

Al comparar con los resultados obtenidos en adultas (con y sin dieta rica en antioxidantes), se apreciaron diferencias significativas en viejas con dieta control y rica en antioxidantes tanto en el tiempo inicial 0 horas ( $p<0,001$ ) como a las 2 y 24 horas ( $p<0,01$  y  $p<0,05$ ) tras la administración del LPS. Los resultados obtenidos entre los grupos que recibieron la endotoxina y sus controles con PBS

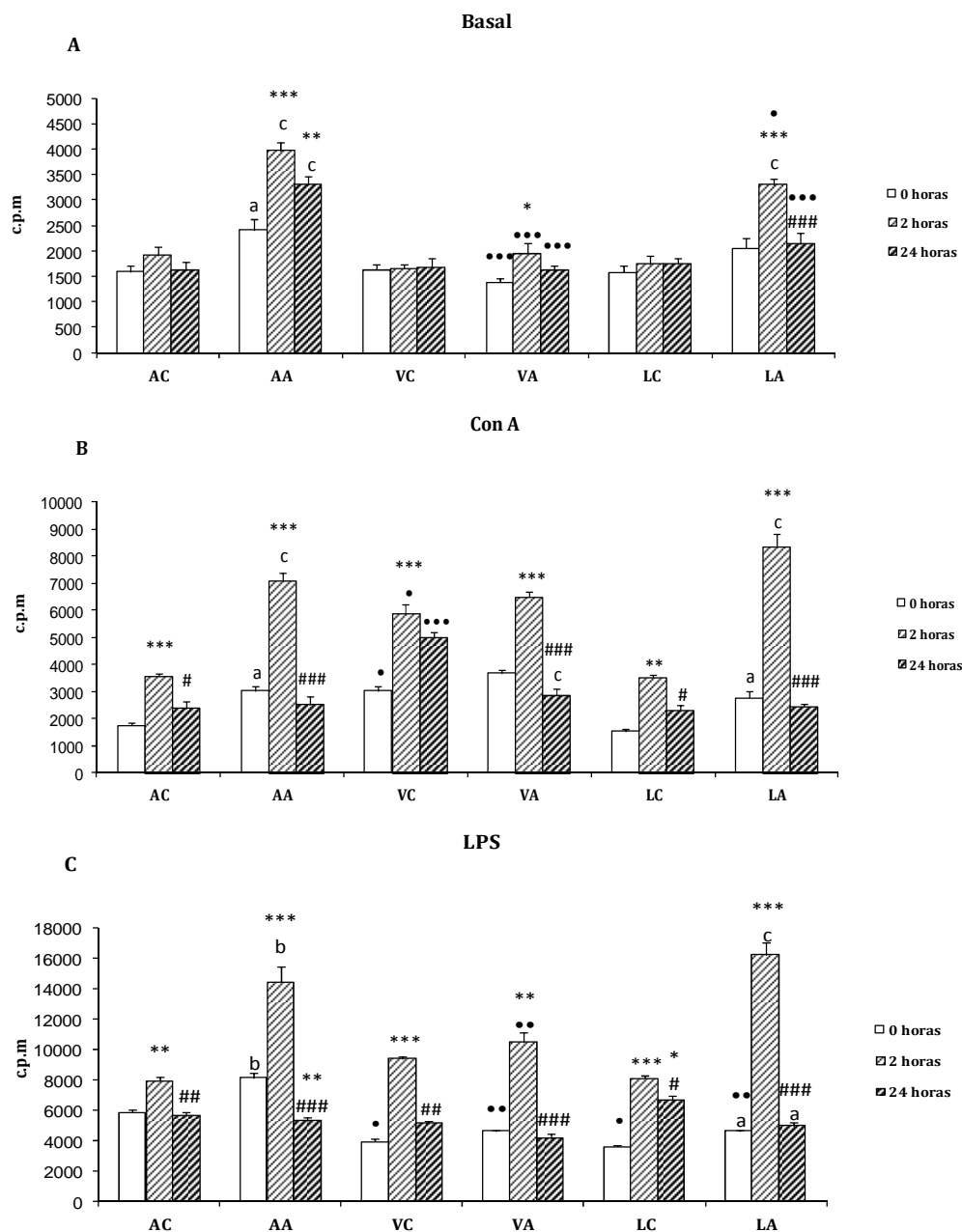
(tabla 32), sólo se mostró un aumento del I.Q en los grupos con dieta suplementada ( $p<0,05$  en adultas y longevas a las 2 horas, y en viejas a las 2 y 24 horas  $p<0,01$ ).

En relación a los resultados de la *linfoproliferación* (figura 70 y tabla 33), a nivel basal (figura 70A), se observó que la administración de LPS la aumentó, respecto al tiempo 0 horas en los grupos que recibieron la dieta suplementada (Ax), a las 2 horas en adultas ( $p<0,001$ ), viejas ( $p<0,05$ ) y longevas ( $p<0,05$ ) y a las 24 horas también en adultas ( $p<0,01$ ). Si se compara los resultados a las 24 horas con relación a las 2 horas, se mostró una disminución en longevas ( $p<0,01$ ). Si comparamos los resultados obtenidos entre los grupos con dieta control y suplementada, se observaron aumentos significativos a las 0 ( $p<0,05$ ), 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ) en adultas, y sólo a las 2 horas ( $p<0,001$ ) en longevas. En lo que respecta a la comparación con los resultados de la edad adulta, se observó una disminución a tiempo 0, 2 y 24 horas en viejas ( $p<0,001$ ) y sólo a las 24 horas en longevas ( $p<0,001$ ) con dieta suplementada con antioxidantes.

Al comparar los resultados obtenidos en los grupos con shock endotóxico y sus correspondientes controles con PBS (tabla 33), se observó en la linfoproliferación basal aumentos de los c.p.m en adultas y longevas con dieta suplementada con antioxidantes a las 0, 2 y 24 horas.

Los resultados obtenidos cuando la linfoproliferación es estimulada por el mitógeno Con A (figura 70B), se observó un aumento, con relación a los controles de dieta, a las 2 y 24 horas en adultas y longevas ( $p<0,05$  y  $p<0,01$ ) y en viejas mostró una disminución a las 24 horas ( $p<0,001$ ). En lo que respecta a la comparación de los resultados obtenidos a las diferentes edades con la adulta, sólo se mostró diferencias significativas en viejas con dieta control a las 0, 2 ( $p<0,05$ ) y

24 horas ( $p < 0,001$ ). Con relación al tiempo 0 horas, se observó un aumento a las 2 horas en adultas con dieta control y suplementada ( $p < 0,01$ ), viejas con dieta control y suplementada ( $p < 0,001$ ) y longevas con dieta control y suplementada ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ), tras recibir la inoculación del LPS. Al comparar los resultados a las 24 horas con respecto a las 2 horas, se apreció una disminución en adultas con dieta control y suplementada ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ ), viejas y longevas con dieta suplementada ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, la linfoproliferación estimulada con LPS (figura 70C), mostró un aumento significativo a las 0 y 2 horas en adultas ( $p < 0,01$ ), y longevas ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ ) y una disminución a las 24 horas ( $p < 0,05$ ), con respecto a los grupos con dieta control. Si consideramos los resultados obtenidos con relación a la edad adulta, se apreció una disminución a tiempo 0 horas, en adultas con dieta control y suplementada ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ), longevas con dieta control ( $p < 0,05$ ) y una elevación en longevas con dieta suplementada ( $p < 0,01$ ). Tras la administración de la endotoxina, sólo se apreció un aumento significativo en viejas con dieta suplementada a las 2 horas ( $p < 0,01$ ). Si consideramos los resultados obtenidos con respecto al tiempo inicial (0 horas), se observó un aumento significativo a las 2 horas en todos los grupos de edad tanto con dieta control como suplementada, adultas ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ), viejas ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ ) y longevas ( $p < 0,001$ ). Si contrastamos las 24 horas con relación a las 2 horas, se observaron disminuciones en todos los grupos de edad.



**Figura 70. Linfoproliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal) (A), y estimulados con concanavalina A (ConA) (B) y lipopolisacárido (LPS) (C), de leucocitos peritoneales de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P < 0,05$ , ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.

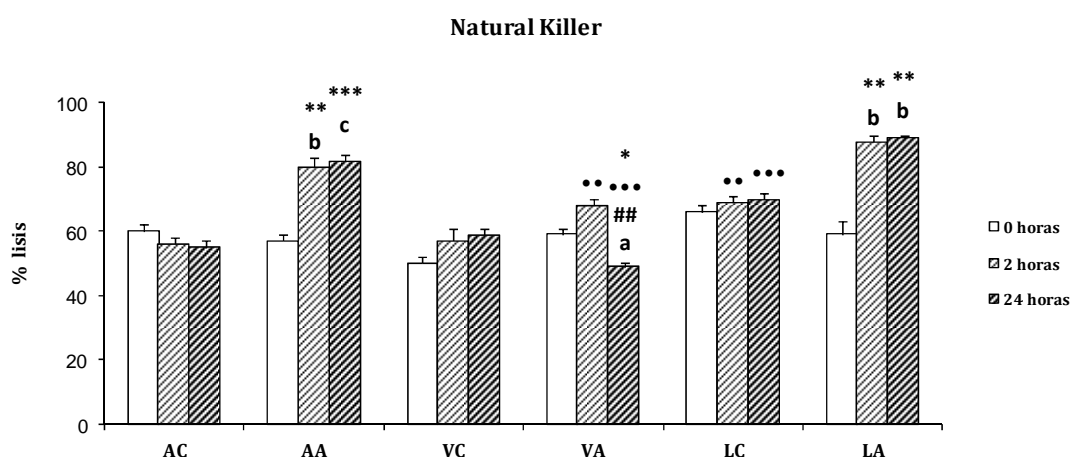
**Tabla 33.** Linfoproliferación (LP) (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal), y estimulados con concanavalina A (Con A) y lipopolisacárido (LPS), procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Linfoproliferación (c.p.m)								
		Basal			Con A			LPS		
		Tiempo (horas)			Tiempo (horas)			Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	1588±119	1913±181	1631±147	1737±116	3567±111*** <sup>3</sup>	2373±277# <sup>3</sup>	5812±241	7909±301** <sup>1</sup>	5622±220##
	Ax	2415±218a <sup>1</sup>	3970±156***c <sup>3</sup>	3305±168**c <sup>3</sup>	3017±196a <sup>3</sup>	7083±294***c <sup>3</sup>	2506±292### <sup>3</sup>	8135±340b <sup>2</sup>	14394±1016***b <sup>3</sup>	5267±290***##
Viejas	Control	1635±106	1656±86	1679±176	3017±197•	5858±341***• <sup>1</sup>	4991±207••• <sup>1</sup>	3924±218•	9353±176*** <sup>3</sup>	5102±167##
	Ax	1377±98•••	1955±197*•••	1616±106•••	3665±134	6499±172*** <sup>3</sup>	2843±234###c	4611±89••	10445±668**•• <sup>3</sup>	4140±306###
Longevas	Control	1576±123	1739±171	1755±105	1519±105	3517±103** <sup>2</sup>	2294±215# <sup>1</sup>	3593±98•	8066±211*** <sup>3</sup>	6624±285*# <sup>2</sup>
	Ax	2049±203 <sup>3</sup>	3297±116***•c <sup>3</sup>	2142±203•••### <sup>3</sup>	2753±236a <sup>1</sup>	8356±467***c <sup>3</sup>	2432±110### <sup>1</sup>	4643±73••a	16173±825***c <sup>3</sup>	4971±211###a
Adultas	Control (PBS)	1498±112	1587±142	1543±112	1782±113	1689±123	1754±111	5423±123	5786±198	5421±126
Viejas		1735±103	1698±123	1542±154	3054±136••	3214±114••	3210±143••	3932±121	3879±187	3654±176
Longevas		1587±121	1467±121	1564±131	1657±187	1587±176	1645±176	3654±133	3421±112	3421±154

Se muestra la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. ••• $P < 0,001$ , •• $P < 0,01$ , • $P < 0,05$  con respecto al correspondiente valor del grupo de edad adulta. \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ### $P < 0,001$ , ## $P < 0,01$ , # $P < 0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con respecto a su correspondiente valor con el grupo con dieta control. <sup>1</sup> $P < 0,05$ , <sup>2</sup> $P < 0,01$ , <sup>3</sup> $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

### Actividad NK de los leucocitos

Los resultados de la actividad *natural killer* de los leucocitos peritoneales, se muestran en la figura 71 y la tabla 34. Tras la administración del LPS a las 2 y 24 horas, supuso un aumento de la actividad NK en adultas ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ ) y longevas ( $p<0,01$ ), y en las viejas, se dio una disminución a las 2 horas ( $p<0,05$ ) con relación a los grupos que recibieron la dieta control. Al comparar con las adultas, se apreció diferencias significativas a las 2 ( $p<0,01$ ) y 24 ( $p<0,001$ ) horas en viejas con dieta suplementada y en longevas con dieta control.



**Figura 71. Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de leucocitos peritoneales de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •• $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.

Si comparamos la actividad NK con el tiempo inicial (0 horas), se observó una elevada actividad a las 2 y 24 horas en adultas ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ ) y longevas

( $p<0,01$ ) con dieta suplementada, por el contrario supuso una disminución en viejas a las 24 horas. Comparando las 24 horas con las 2 horas sólo se apreció diferencia significativa en las viejas, con una disminución del porcentaje de lisis ( $p<0,01$ ).

Al comparar los resultados obtenidos en los grupos de edad que recibieron la dosis de LPS, con relación a los grupos control (con PBS) (tabla 34), se mostró un aumento de la actividad NK ( $p<0,001$ ) a las 2 y 24 horas en adultas y Longevas y sólo a las 2 horas en viejas ( $p<0,05$ ) con dieta suplementada, y a las 24 horas en longevas con dieta control.

**Tabla 34.** Actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Natural killer (% lisis)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	60±2	56±2	55±2
	Ax	57±2	80±3**b <sup>3</sup>	82±2***c <sup>3</sup>
Viejas	Control	50±2	57±4	59±2
	Ax	59±2	68±2•• <sup>1</sup>	49±1*•••##a
Longevas	Control	66±2	69±2••	70±2••• <sup>1</sup>
	Ax	59±4	88±2**b <sup>3</sup>	89±1**b <sup>3</sup>
Adultas	Control (PBS)	61±2	60±2	61±2
Viejas		56±2	54±2	52±2
Longevas		63±2	60±2	62±2

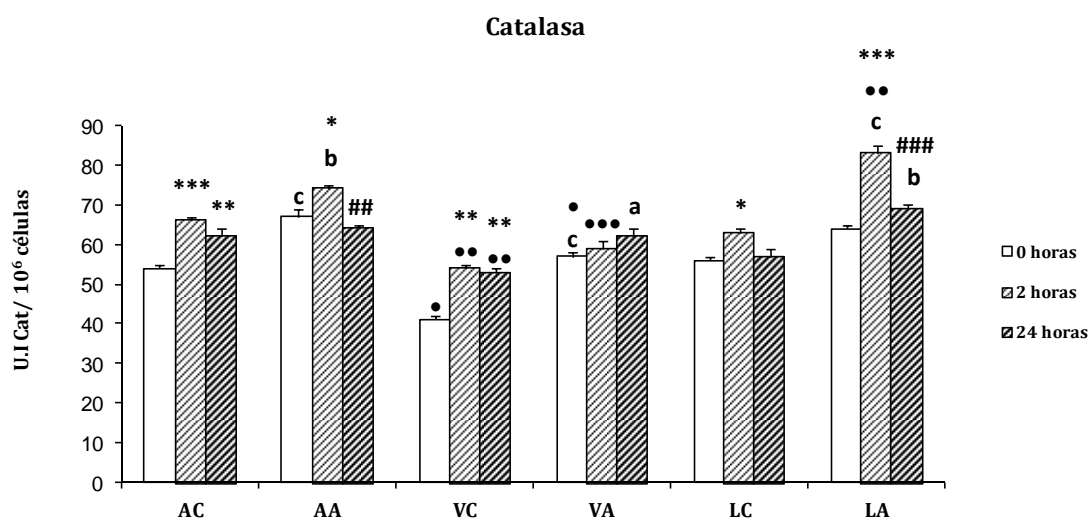
Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. •  $P<0,05$ , ••  $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor de grupo con dieta control. <sup>1</sup> $P<0,05$ , <sup>2</sup> $P<0,01$ , <sup>3</sup> $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).



#### 4.4.3. Estudio del estrés oxidativo

##### Defensas antioxidantes

Los resultados correspondientes a la actividad enzimática de catalasa (CAT) y niveles de glutatión (GSH), se muestran en las figuras 72 y 73, y en las tablas 35 y 36. La CAT de leucocitos peritoneales, procedentes de ratones con shock endotóxico (figura 72), mostraron aumentos en todos los grupos de edad en relación a los que recibieron dieta normal (en adultas y longevas a las 2 horas, y a las 24 horas en viejas y longevas, y solo se observó un aumento en el tiempo 0 horas en viejas).



**Figura 72. Actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) (U.Icat/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ## $P<0,01$ , ### $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor de grupos con dieta control.

Respecto a la edad adulta con el resto de edades analizadas, se observó que las viejas con dieta control tienen menores valores de CAT a las 0 ( $p<0,05$ ), 2 y 24

horas ( $p<0,01$ ) y con dieta suplementada a las 0 y 2 horas ( $p<0,01$ ,  $p<0,001$ , respectivamente), y sólo se observó un incremento ( $p<0,001$ ) a las 2 horas en longevas con dieta suplementada. En relación al tiempo 0 h, tras la administración del LPS, se mostraron aumentos significativos a las 2 y 24 horas en adultas ( $p<0,001$ ) y viejas ( $p<0,01$ ) con dieta control, y a las 2 horas en viejas ( $p<0,05$ ) y longevas ( $p<0,001$ ) con dieta rica en antioxidantes. Al comparar los resultados de las 24 horas con los obtenidos a las 2 horas se apreció una disminución en adultas y longevas con dieta rica en antioxidantes.

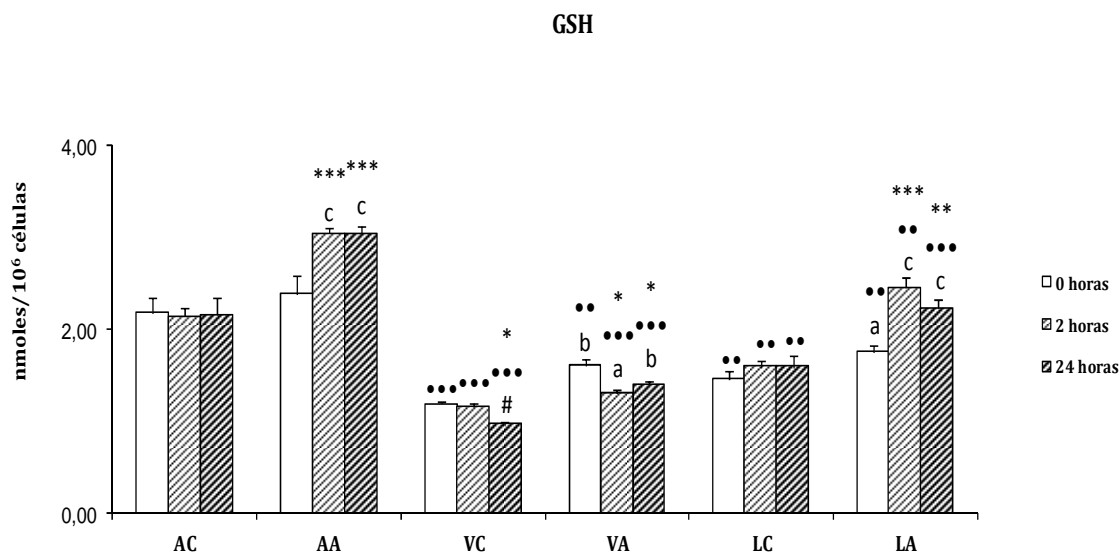
**Tabla 35.** Actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) (U.I cat/ $10^6$  células) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Catalasa (U. I cat/ $10^6$ células)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	54±1 <sup>2</sup>	66±1***	62±2**
	Ax	67±2c	74±1*b <sup>2</sup>	64±1##
Viejas	Control	41±1•	54±1**•• <sup>1</sup>	53±1**••
	Ax	57±1•c <sup>3</sup>	59±2••• <sup>3</sup>	62±2a <sup>3</sup>
Longevas	Control	56±1	63±1*	57±2
	Ax	64±1b	83±2***••c <sup>3</sup>	69±1###b
Adultas	Control (PBS)	69±3	66±3	68±4
Viejas		40±3	43±4	45±2
Longevas		61±2	63±4	60±4

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor de grupo con dieta control. <sup>1</sup> $P<0,05$ , <sup>2</sup> $P<0,01$ , <sup>3</sup> $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes típicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

Al observar los resultados obtenidos, entre los grupos con shock y sus correspondientes controles (PBS) (tabla 35), se aprecia un aumento en los animales con la endotoxemia, el cual es significativo en adultas sin y con dieta

suplementada (0 horas y 2 horas, respectivamente) viejas sin y con dieta suplementada (2 horas y 0, 2 y 24 horas, respectivamente) y sólo en longevas con dieta rica en Ax a las 2 horas.



**Figura 73. Niveles de glutatión reducido (GSH) (nmoles/10<sup>6</sup>células) de leucocitos peritoneales de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. #  $P < 0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto a las adultas. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor de grupos con dieta control.

Los resultados correspondientes al contenido GSH (expresado en nmoles/10<sup>6</sup> células, se recogen en la figura 73. Al comparar los resultados obtenidos con relación a los que recibieron dieta control, se mostró aumentos significativos a las 0, 2 y 24 horas en todas las edades analizadas (excepto las 0 horas de adultos). En comparación con la edad adulta, a tiempo 0, 2 y 24 horas, tuvo lugar una disminución en viejas y longevas tanto con dieta control como suplementada con antioxidantes. Si analizamos con respecto al tiempo 0 horas, la administración de LPS, produjo un aumento significativo de los niveles de este

antioxidante a las 2 y 24 horas en adultas y longevas (con dieta rica en antioxidantes), y una disminución en viejas (con dieta control y con antioxidantes). Sólo se apreció una disminución significativa ( $p<0,05$ ) a las 24 horas con relación a las 2 horas en viejas con dieta control. Cuando se analizaron los resultados obtenidos de los niveles de GSH, entre los grupos que recibieron el LPS y sus correspondientes controles que recibieron PBS (tabla 36), se observaron aumentos significativos en de este antioxidante con el shock endotóxico a las 0, 2 y 24 horas en adultas, viejas y longevas con dieta rica en antioxidantes.

**Tabla 36.** Niveles de glutatión reducido (GSH) (nmoles/ $10^6$  células de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Glutatión total (nmol/ $10^6$ células)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	2,18±0,17	2,13±0,10	2,15±0,19
	Ax	2,38±0,21 <sup>1</sup>	3,04±0,06***c <sup>3</sup>	3,05±0,08***c <sup>3</sup>
Viejas	Control	1,19±0,03•••	1,15±0,05•••	0,96±0,02*•# <sup>2</sup>
	Ax	1,61±0,07•• <sup>2</sup>	1,31±0,04*•••a <sup>1</sup>	1,39±0,05*•••b <sup>1</sup>
Longevas	Control	1,46±0,08••	1,59±0,06•• <sup>1</sup>	1,59±0,12•• <sup>1</sup>
	Ax	1,75±0,07••a <sup>2</sup>	2,45±0,12**••c <sup>3</sup>	2,23±0,10**•••c <sup>3</sup>
Adultas	(PBS)	2,14±0,14	2,16±0,17	2,16±0,19
Viejas		1,18±0,19	1,17±0,17	1,16±0,17
Longevas		1,44±0,16	1,48±0,19	1,49±0,18

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. •  $P<0,05$ , ••  $P<0,01$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor de grupo con dieta control. <sup>1</sup> $P<0,05$ , <sup>2</sup> $P<0,01$ , <sup>3</sup> $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

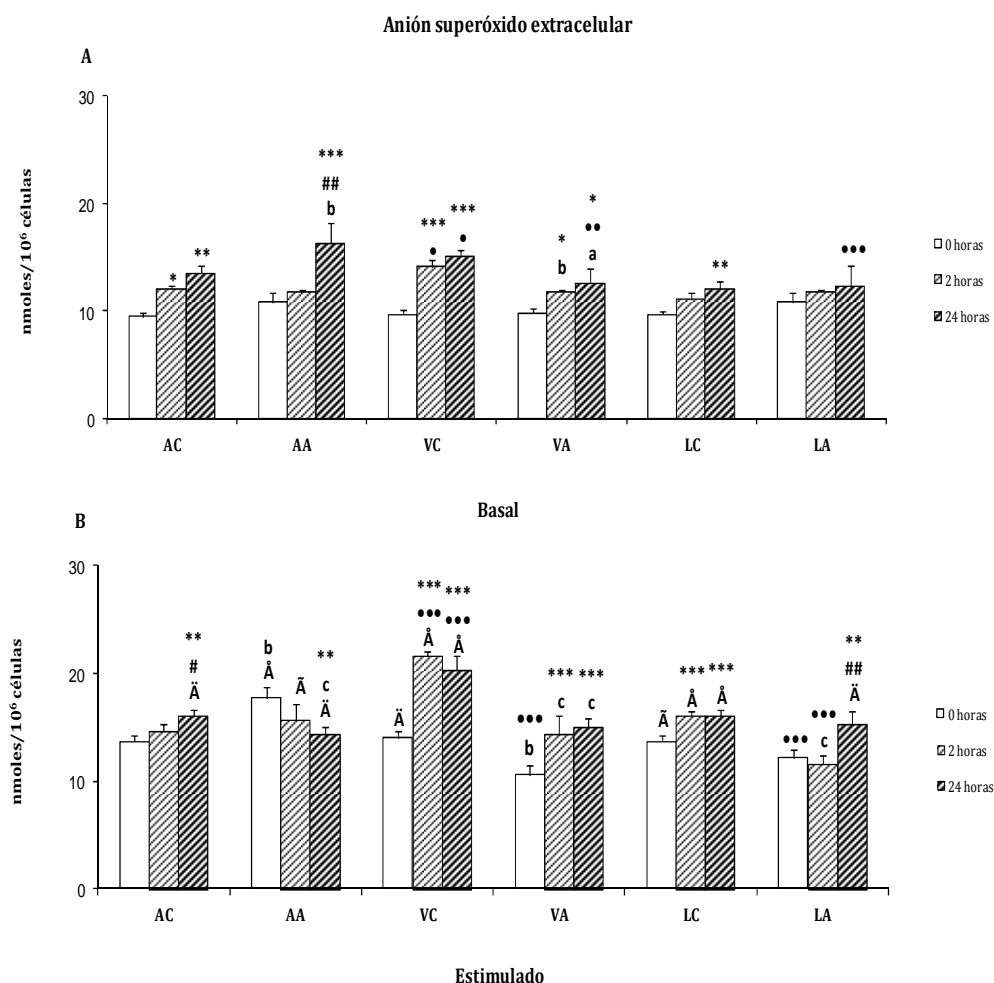
### **Compuestos oxidantes**

En la figuras (74 y 75) y tablas (37 y 38) se representa los niveles de *anión superóxido extracelular* ( $O_2^{\cdot-}$ ), tanto liberado en condiciones basales como en

estimulación con látex y la actividad xantina oxidasa (XO) de leucocitos peritoneales.

En los resultados obtenidos para el  $O_2^{\cdot-}$  (figura 74), se observó disminuciones bajo estimulación con látex, en todos los grupos de edad con dieta rica en antioxidantes en relación con los que recibieron la dieta control. Cuando se comparan los valores en relación a los obtenidos en las adultas con dieta control, se observó que a las 2 y 24 h, hay un aumento significativo en viejas tanto en el estado basal como estimulado ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ). Al comparar las adultas con dieta suplementada, se observó una disminución en viejas y en longevas del  $O_2^{\cdot-}$  basal (a las 24 horas) como estimulado (2 y 24 horas). Por otro lado, a las 2 y 24 horas, en general, tras la administración de la endotoxina se da un aumento significativo de estos niveles, tanto en basales como en la estimulada (con excepción en adultas con dieta con Ax) con respecto al tiempo inicial 0 h. Los valores a 24 horas con respecto a las de 2 horas, se mostró un aumento en adultas (basal) y longevas (estimulados) con dieta suplementada con antioxidantes ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ , respectivamente).

Con relación al estado basal, se observaron elevaciones significativas tras la estimulación con látex, en adultas (dieta control) y longevas (dieta con Ax) a las 24 horas, y en adultas (dieta con Ax), viejas y longevas (dieta control) a las 0, 2 y 24 horas (con excepción de las 0, 2 y 24 horas en viejas con dieta suplementada).



**Figura 74. Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot -}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal (A) y bajo la estimulación con partículas de látex (B) de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P<0,05$ , ##  $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •••  $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.  $\tilde{A}$   $P<0,05$ ,  $\tilde{A}$   $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor del estado basal.

Cuando comparamos los resultados obtenidos con respecto a los grupos con PBS (tabla 38), se observaron aumentos de los niveles del  $O_2^{\cdot -}$  basales, a las 24 horas en adultas y longevas, y a las 2 y 24 horas en viejas tanto con dieta control como rica en antioxidantes, también se mostraron elevaciones del  $O_2^{\cdot -}$  en los

grupos con dieta control y suplementada en el estado estimulado (excepto en el tiempo inicial 0 h en adultas con dieta Ax, que se observó una disminución).

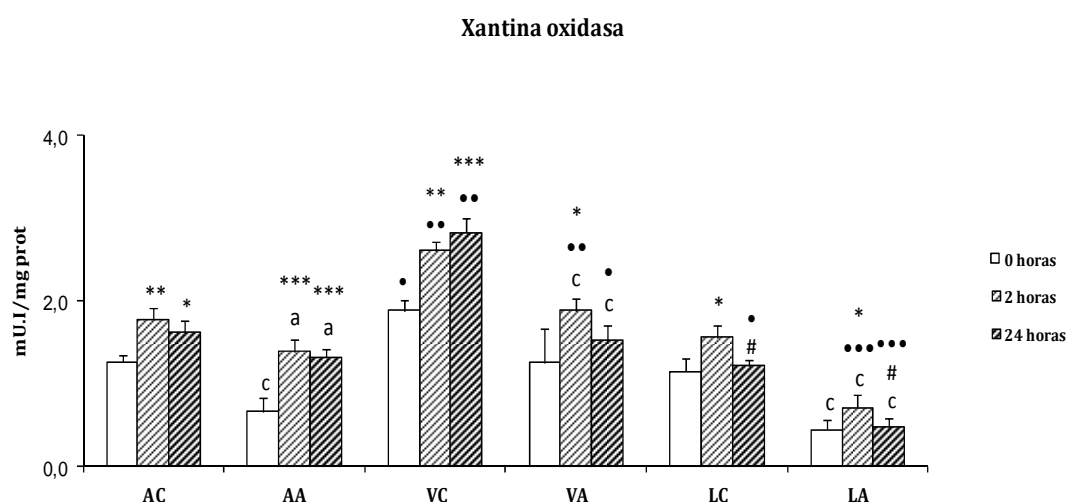
**Tabla 37.** Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^-$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y tras la estimulación con partículas de látex de macrófagos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Dieta		Anión superóxido extracelular (nmol/ $10^6$ células)					
Grupos experimentales (Edad)		Basal			Estimulado		
		Tiempo (horas)			Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	9,5±0,3	12,1±0,3*	13,5±0,7** <sup>2</sup>	13,7±0,5Å	14,6±0,7Å	16,0±0,7**#Å <sup>2</sup>
	Ax	10,8±0,9	11,8±0,2	16,3±1,9***##b <sup>3</sup>	17,7±1,0bÅ <sup>2</sup>	15,7±1,5Å <sup>1</sup>	14,3±0,8**cÅ
Viejas	Control	9,7±0,4	14,1±0,6***• <sup>3</sup>	15,1±0,6***• <sup>3</sup>	14,0±0,6Å	21,6±0,5***••Å <sup>3</sup>	20,3±1,4***•••Å <sup>3</sup>
	Ax	9,8±0,4	11,8±0,2*b <sup>1</sup>	12,6±1,4*••a <sup>1</sup>	10,62±0,9•••b <sup>3</sup>	14,3±1,8***c <sup>1</sup>	15,0±0,8***c <sup>1</sup>
Longevas	Control	9,7±0,3	11,1±0,6	12,1±0,7** <sup>1</sup>	13,7±0,5Å	16,1±0,4***Å <sup>3</sup>	16,0±0,0***Å <sup>3</sup>
	Ax	10,8±0,9	11,8±0,2	12,3±1,9••• <sup>1</sup>	12,2±0,8•••	11,6±0,8•••c	15,2±1,3***##Å <sup>2</sup>
Adultas	Control (PBS)	10,8±0,2	11,1±0,5	10,9±0,5	14,2±0,4Å	13,1±1,5Å	13,4±1,3Å
Viejas		10,2±0,4	9,2±0,4	10,5±0,3	11,2±1,3	12,1±1,2Å	11,2±1,2
Longevas		10,2±0,1	11,1±0,2	9,3±0,6	11,2±1,2	12,2±1,1	11,1±1,1Å

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P < 0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •  $P < 0,05$ , ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control. Å  $P < 0,05$ , Ä  $P < 0,01$ , Å  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor del estado basal. <sup>1</sup> $P < 0,05$ , <sup>2</sup> $P < 0,01$ , <sup>3</sup> $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).



La actividad xantina oxidasa (figura 75), disminuyó en los grupos que recibieron la dieta suplementada con antioxidantes, a las 0, 2 y 24 horas en adultas ( $p<0,001$  y  $p<0,05$ ) y longevas ( $p<0,001$ ), y en viejas ( $p<0,001$ ) a las 2 y 24 horas. Si comparamos los resultados obtenidos con respecto a las adultas, se apreció aumentos significativos en viejas y longevas con dieta control (a las 0, 2 y 24 y sólo a las 24 horas, respectivamente) y también en viejas con dieta suplementada (Ax) a las 2 y 24 horas ( $p<0,01$  y  $p<0,05$ ), en cambio las longevas con dieta suplementada mostraron una disminución de la actividad xantina oxidasa a las 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ).



**Figura 75. Actividad xantina oxidasa (XO) (mU.I./mg prot) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR/CD1 adultas, viejas y longevas, tras el shock endotóxico y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. AC= adultas con dieta control; AA= adultas con dieta suplementada con antioxidantes; VC= viejas con dieta control; VA= viejas con dieta suplementada con antioxidantes; LC=longevas con dieta control y LA= longevas con dieta suplementada con antioxidantes. \*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P<0,05$ , ##  $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control.

Con respecto al tiempo inicial (0 horas), sólo se observaron elevaciones significativas a las 2 horas ( $p<0,05$ ), tras recibir la endotoxina en todos los grupos de edad (excepto las adultas con dieta rica en antioxidantes y el viejas con dieta control que mostraron las elevaciones tanto a las 2 y 24 horas). Con relación a las 24 horas, sólo se mostró una disminución en longevas con dieta suplementada (Ax) ( $p<0,05$ ). Al comparar los resultados obtenidos con relación a los grupos controles (PBS) (tabla 38), se apreció aumentos significativos de esta enzima oxidante en adultas ( $p<0,05$  y viejas ( $p<0,001$ ) con dieta control a las 2 y 24 horas tras recibir la administración de la endotoxina, por el contrario los grupos que recibieron la dieta suplementada con antioxidantes manifestaron una disminución de la actividad oxidante de XO.

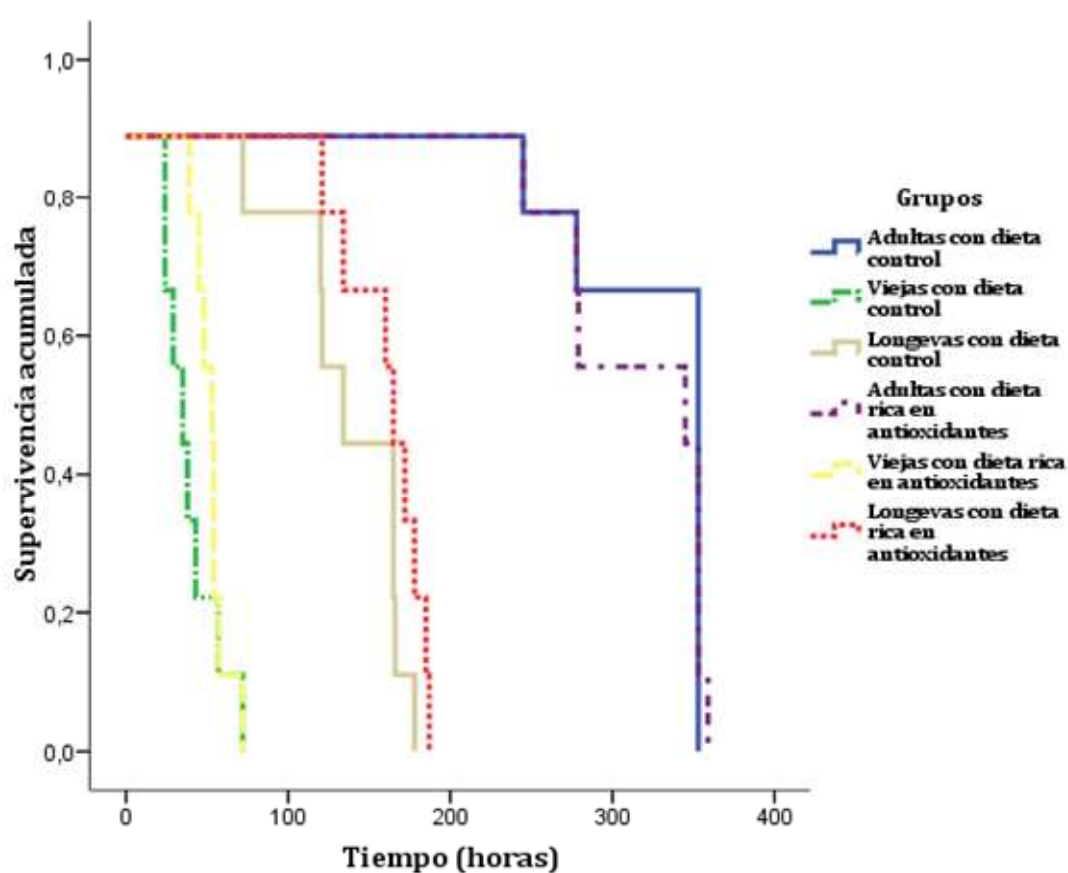
**Tabla 38.** Actividad xantina oxidasa (XO) (mU.I/mg prot) de leucocitos peritoneales procedentes de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas, en situación previa (0 horas) y a las 2 y 24 horas tras la administración de PBS o de 50 mg/kg de LPS.

Grupos experimentales (Edad)	Dieta	Xantina oxidasa (mU.I/mg prot)		
		Tiempo (horas)		
		0 horas	2 horas	24 horas
Adultas	Control	1,26±0,08	1,78±0,13** <sup>1</sup>	1,62±0,14* <sup>1</sup>
	Ax	0,66±0,16c <sup>3</sup>	1,39±0,15***a	1,32±0,09***a
Viejas	Control	1,88±0,13•	2,61±0,11**•• <sup>3</sup>	2,83±0,17***•• <sup>3</sup>
	Ax	1,25±0,41a <sup>1</sup>	1,88±0,16*••c <sup>2</sup>	1,52±0,19•c
Longevas	Control	1,15±0,15	1,56±0,14*	1,21±0,07•#
	Ax	0,44±0,11c <sup>3</sup>	0,71±0,16*•••c <sup>3</sup>	0,47±0,10•••#c <sup>3</sup>
Adultas	Control (PBS)	1,22±0,04	1,20±0,02	1,23±0,03
Viejas		1,70±0,09	1,67±0,07	1,65±0,16
Longevas		1,16±0,08	1,17±0,05	1,15±0,11

Cada dato es la media ± el error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. # $P<0,05$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. • $P<0,05$ , •• $P<0,01$ , ••• $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en adultas. a  $P<0,05$ , c  $P<0,001$  con respecto a su correspondiente valor en el grupo de dieta control. <sup>1</sup> $P<0,05$ , <sup>2</sup> $P<0,01$ , <sup>3</sup> $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor en controles (PBS). Ax: dieta suplementada con antioxidantes tiólicos (0,1% de NAC + 0,1% de TP).

#### 4.4.4. Supervivencia

En la figura 76 se representan los resultados obtenidos en la supervivencia de los animales, tras la administración de la dosis de 50 mg/kg de LPS, en los diferentes grupos experimentales de adultas, viejas y longevas con dieta control y suplementada con antioxidantes.



**Figura 76.** Curvas de supervivencia en horas tras la inducción de un shock endotóxico (50mg/kg) en ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas y que ingirieron dieta control y suplementada con 0,1% de NAC + 0,1% de TP durante cuatro semanas. Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental.

Se aprecia que los grupos de edad adulta, no manifestaron bajas en el número de animales, tras la endotoxemia. La tasa de supervivencia mínima y

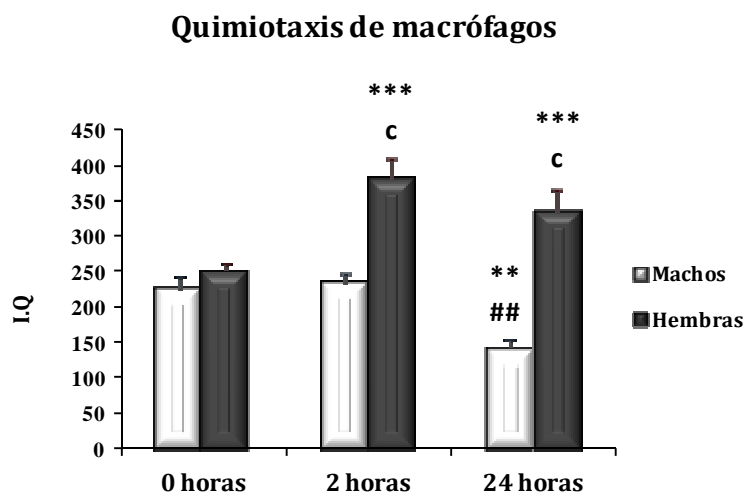
máxima para la edad vieja con dieta control fue de 22 y 49 horas, respectivamente, con una supervivencia media de 36 horas. Para el grupo de viejas con dieta rica en antioxidantes fue de 34 y 60 horas, con una media de 47 horas, y por último, los grupos de edad longeva con dieta control fue de 87 y 162 horas con una media 125 horas, y con dieta rica en antioxidantes fue de 106 y 183 horas, con una media de 145 horas. El análisis estadístico con el test de *Kaplan-Meier* reveló una diferencia significativa global entre grupos (Log Rank [Mantel-Cox]= 0,0012).

**4.5. Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Estudio de la supervivencia de ratones C57BL6/129, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.**

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en relación a los cambios en parámetros de la función inmunitaria y de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos ( $88 \pm 2$  y  $84 \pm 2$  semanas de edad), y de su supervivencia tras la administración de 50 mg/kg de LPS de *E.coli*.

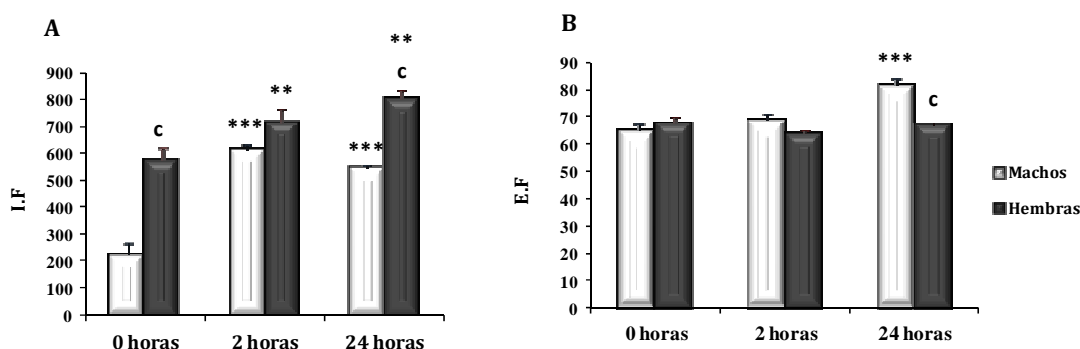
**Capacidad funcional de macrófagos**

Los resultados correspondientes a las funciones analizadas en macrófagos, se muestran en las figuras 1, 2 y 3 y en la tabla A. En lo referente a los índices de quimiotaxis de macrófagos (figura 77) en los animales hembras, se observó un aumento a las 2 y 24 horas ( $p < 0,001$ ) tras la administración del LPS, con respecto al estado inicial (tiempo 0h). Por el contrario, en los ratones machos se observó un mantenimiento del I.Q a las 2 horas, y una disminución a las 24 horas ( $p < 0,01$ ). Comparando los I.Q obtenidos en las hembras en relación a los machos se pareció unos valores mayores ( $p < 0,001$ ), en aquellos tanto a las 2 horas como a las 24 horas tras la administración del LPS.



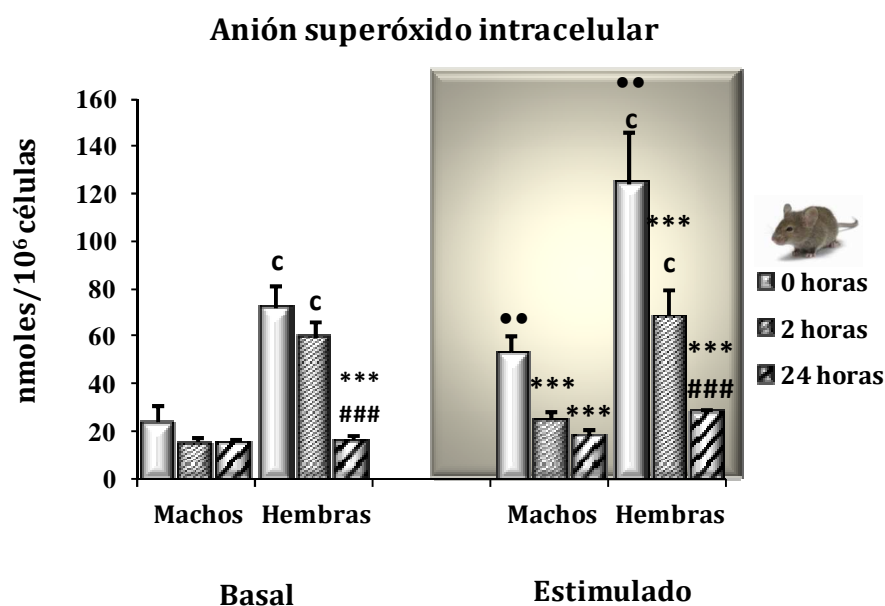
**Figura 77. Índice de quimiotaxis (I.Q.) de macrófagos peritoneales (número de macrófagos por filtro) de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), realizado por duplicado. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor de la 0 horas. ##  $P < 0,01$ , con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. c  $P < 0,001$ , al correspondiente valor al grupo de ratones machos.

En lo referente a la capacidad fagocítica de los macrófagos, los índices de fagocitosis aumentaron tanto en machos como en hembras a las 2 y 24 horas tras recibir la endotoxina, con respecto al estado inicial (tiempo 0 h). Los valores de I.F fueron mayores ( $p < 0,001$ ) en las hembras que en los machos tanto a tiempo 0 horas como a las 24 horas. En cuanto a la eficacia de la fagocitosis, no se muestran cambios significativos en el grupo de las hembras, mientras que los machos presentaron un aumento a las 24 horas ( $P < 0,001$ ) con respecto al estado inicial (tiempo 0 h). A esas 24 horas los valores de E.F en hembras fueron menores ( $p < 0,001$ ) que en machos.



**Figura 78.** Índice de fagocitosis (I.F) (número de bolas de látex/100 macrófagos) (A) y eficacia fagocítica (E.F) (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos) (B), de macrófagos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de los ensayos realizados por duplicado.  $**P<0,01$ ,  $***P<0,001$  con respecto al valor de la 0 horas. <sup>c</sup>  $P<0,001$ , al correspondiente valor en los ratones machos.

Los resultados de los niveles del anión superóxido intracelular ( $\text{nmol}/10^6$  células) tanto basal como tras la estimulación con partículas de látex (figura 79), mostraron una disminución de este radical en todos los grupos estudiados a las 2 y 24 horas, tras la inyección de la endotoxina que fue estadísticamente significativo ( $p<0,001$ ) en machos y en hembras en condición estimulada y a las 24 horas en hembras en la condición basal (no estimulada). Se observó, que los niveles del anión superóxido en hembras son mayores que los mostrados en machos, tanto en el estado basal como en el estado estimulado, y tanto a tiempo 0 horas como a las 2 horas de administración del LPS ( $p<0,001$ ).

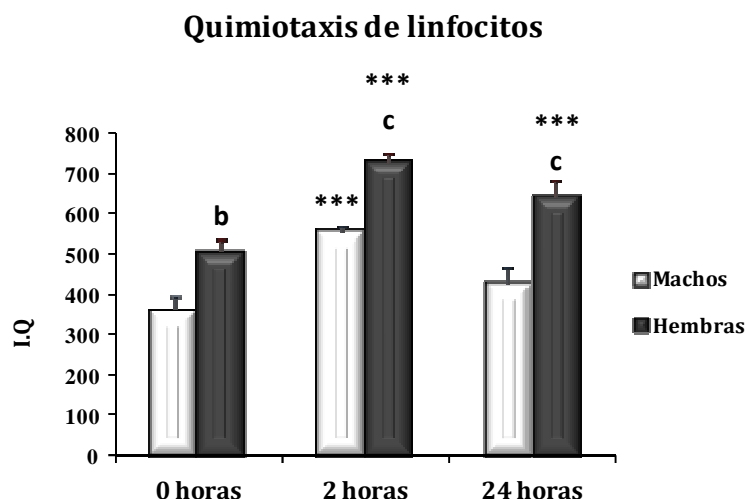


**Figura 79. Niveles de anión superóxido intracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y bajo la estimulación con partículas de látex, de macrófagos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ###  $P<0,001$ , con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. ••  $P<0,01$ , con respecto al correspondiente valor basal. c  $P<0,001$  con relación al correspondiente valor al grupo de machos.

### Capacidad funcional de linfocitos

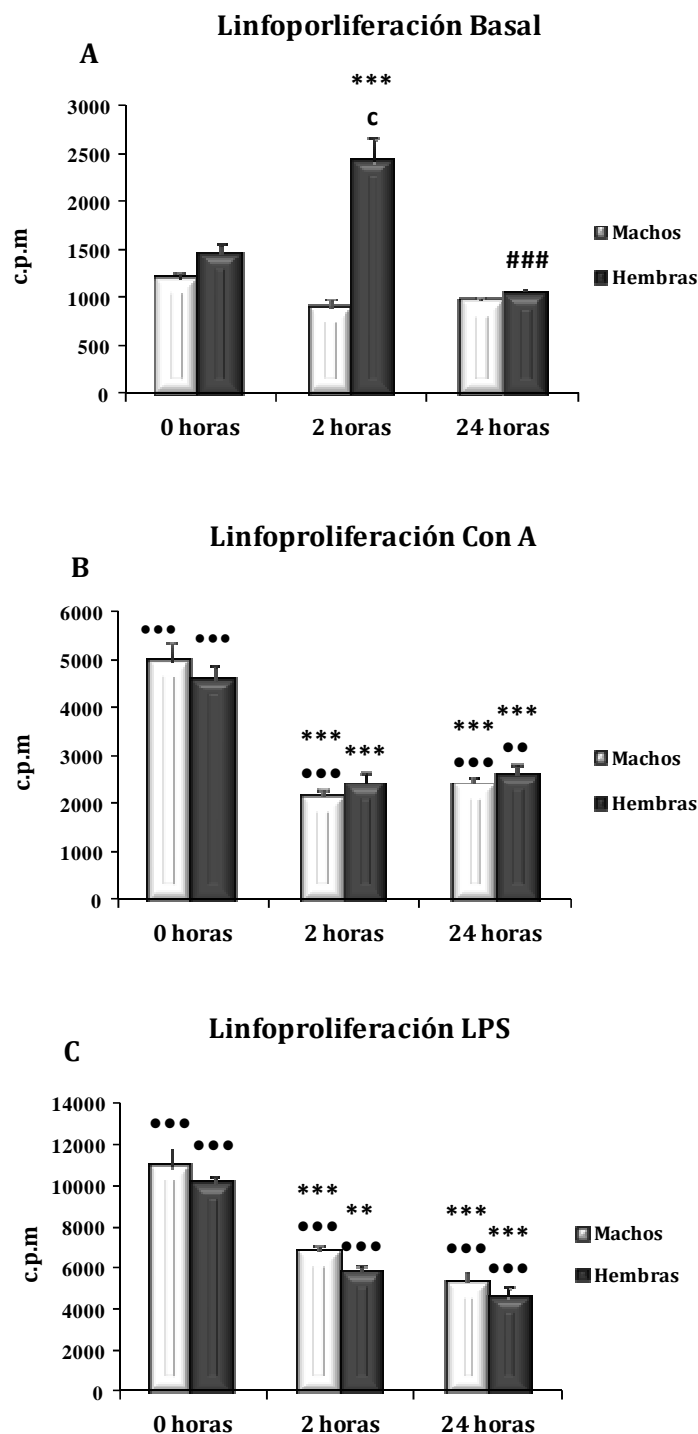
Los resultados obtenidos en las funciones de los linfocitos a lo largo del shock endotóxico, se muestran en las figuras 4, 5 y 6 y en la tabla A. En los índices de quimiotaxis (figura 79) se observó un aumento muy significativo ( $P<0,001$ ) a partir de las 2 horas, tras recibir la inyección del LPS, tanto en machos como en hembras, también a las 24 horas ( $P<0,001$ ) en el caso de la hembras, con respecto al estado inicial (tiempo 0 h). Los valores de I.Q fueron mayores en las hembras en comparación con los machos a todos los tiempo analizados, 0 horas ( $p<0,01$ ) y 2 y 24 horas ( $p<0,001$ ).





**Figura 79. Índice de quimiotaxis (I.Q.) de linfocitos peritoneales (número de linfocitos por filtro) de ratones C57BL/6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con relación al correspondiente valor al grupo de machos.

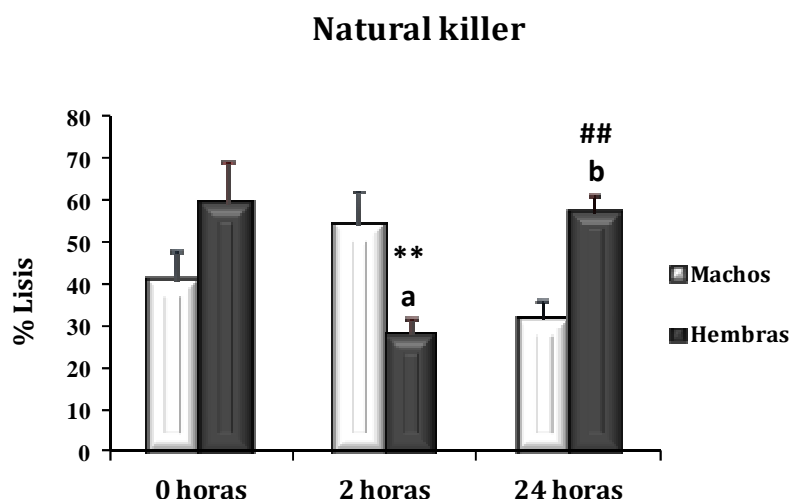
En cuanto a la proliferación (figura 80) en ausencia de estímulo (basal), a nivel basal (Fig. 80A) se observó, un aumento a las 2 horas ( $P < 0,001$ ) en hembras, en relación con las 0 horas y también respecto a las 24 horas. En este tiempo los valores de 2 horas los c.p.m fueron mayores en hembras que en machos ( $p < 0,001$ ). La proliferación en presencia de los mitógenos Con A y LPS (Fig. 80 B y C) mostró una disminución en machos y hembras a las 2 y 24 horas, tras recibir la dosis de LPS, en comparación con las 0 horas. No se apreciaron diferencias entre machos y hembras.



**Figura 80. Linfoproliferación (cuentas por minuto) de linfocitos peritoneales no estimulados (basal) (A), y estimulados con concanavalina A (ConA) (B) y lipopolisacárido (LPS) (C), procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.  $**P<0,01$ ,  $***P<0,001$  con respecto al valor de la 0 horas.  $###P<0,001$ , con respecto a las 2 horas.  $\bullet\bullet P<0,01$ ,  $\bullet\bullet\bullet P<0,001$  con respecto al correspondiente valor al basal.  $c P<0,001$  con respecto a los machos.

### **Actividad NK de leucocitos**

La actividad NK (figura 81), mostró una disminución en hembras a las 2 horas ( $p<0,01$ ), tras recibir la dosis de LPS, con respecto al tiempo 0 horas y también en comparación con el correspondiente valor a las 24 horas. En los machos no se observaron diferencias. Al comparar los machos y las hembras, éstas presentaron menores ( $p<0,01$ ) % de lisis que los machos a las 2 horas y mayores ( $p<0,01$ ) a las 24 horas.

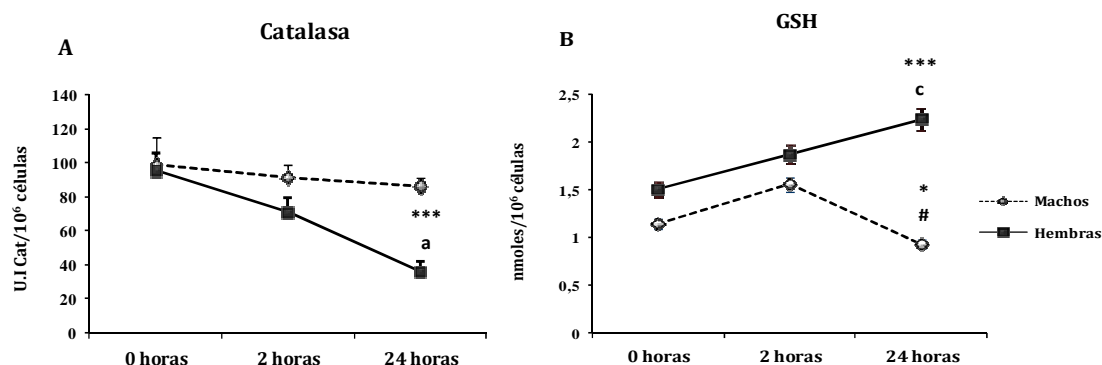


**Figura 81. Actividad natural killer NK (% lisis) de linfocitos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P<0,01$ , con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P<0,001$ , con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. a  $P<0,05$ , b  $P<0,01$  con respecto al correspondiente valor en machos.

### **Defensas antioxidantes y niveles de compuestos oxidantes**

Seguidamente se presentan los resultados obtenidos en el análisis de las defensas antioxidantes (actividad de catalasa y contenido de GSH), así como, de los oxidantes (niveles de anión superóxido extracelular y actividad de xantina oxidasa) de leucocitos peritoneales de ratones C57BL6/129 machos y hembras.

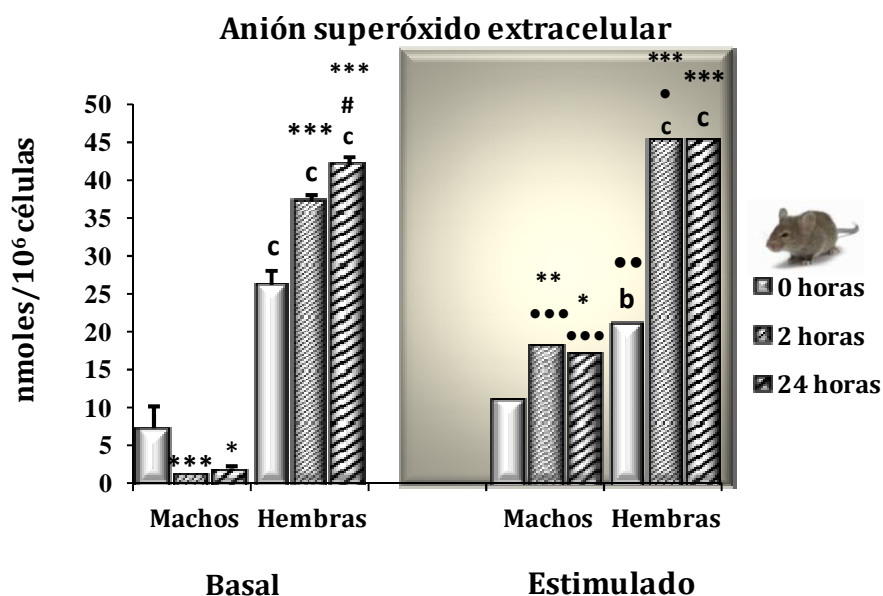
En primer lugar los resultados correspondientes a las *defensas antioxidantes* como la actividad de catalasa y el contenido de GSH en leucocitos peritoneales, a lo largo del shock endotóxico, se muestran en la gráfica 82 y tabla 39.



**Figura 82. Actividad de la catalasa (U.Icat/10<sup>6</sup> células) (A) y contenido de GSH (nmoles/10<sup>6</sup> células) (B) de leucocitos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al valor de la 0 horas. #  $P < 0,05$ , con respecto a las 2 horas. a  $P < 0,05$ , c  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en machos.

La *actividad catalasa* disminuyó tras la inyección del LPS, siendo esta bajada sólo estadísticamente significativo a las 24 horas ( $P < 0,001$ ), en hembras con respecto al estado inicial (tiempo 0 h) (Fig. 82 A). En lo que respecta al contenido de *glutación reducido* en los leucocitos peritoneales, los de las hembras, aumentaron progresivamente, siendo la diferencia estadísticamente significativa a las 24 horas tras la administración de la endotoxina, en relación con el estado inicial (0 horas). Por el contrario, los animales machos manifestaron un descenso del contenido de este antioxidante a las 24 horas ( $P < 0,05$ ), con respecto a la condición inicial (tiempo 0) (Fig. 82 B). Comparando los valores de GSH entre

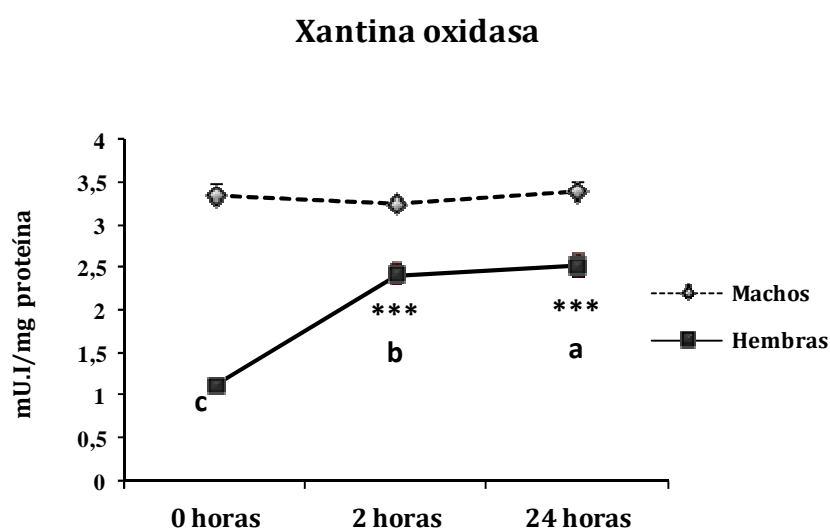
machos y hembras, se observó que los mismos eran significativamente mayores ( $p<0,001$ ) en las hembras a las 24 horas.



**Figura 83. Niveles de anión superóxido extracelular ( $O_2^{\cdot-}$ ) (nmol/ $10^6$  células) basal y bajo la estimulación con partículas de látex, de macrófagos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P<0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ###  $P<0,001$ , con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. ••  $P<0,01$ , con respecto al correspondiente valor basal. c  $P<0,001$  con relación al correspondiente valor al grupo de machos.

En los referente a los niveles de anión superóxido extracelular (Fig. 83 y tabla 39), se observó un aumento significativo ( $p<0,001$ ) en las hembras a las 2 y 24 horas tras la administración del LPS, tanto en situación basal como estimulada. Ese aumento se dio en machos sólo en muestras estimuladas con látex, mientras que en el estado no estimulado tuvo lugar una disminución comparando los valores entre los machos y hembras, en todos los casos fueron mayores en éstas últimas.

En cuanto a la actividad xantina oxidasa (figura 84), la misma presentó un incremento a las 2 y 24 horas ( $P<0,001$ ) en hembras en comparación con el valor a tiempo 0 h, mientras que en los machos no se aprecian cambios significativos, tras el shock endotóxico. Cabe destacar que la actividad de esta enzima en estos últimos, fue mayor en todas las horas valoradas, en comparación con la registrada en hembras.



**Figura 84. Actividad xantina oxidasa (mU.I./mg proteína) de leucocitos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos, tras el shock endotóxico.** Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\*  $P<0,001$  \* $P<0,05$ , con respecto al valor de la 0 horas. #  $P<0,05$ , con respecto a las 2 horas. c  $P<0,001$ , b  $P<0,01$ , a  $P<0,05$ , con respecto al correspondiente valor en machos.

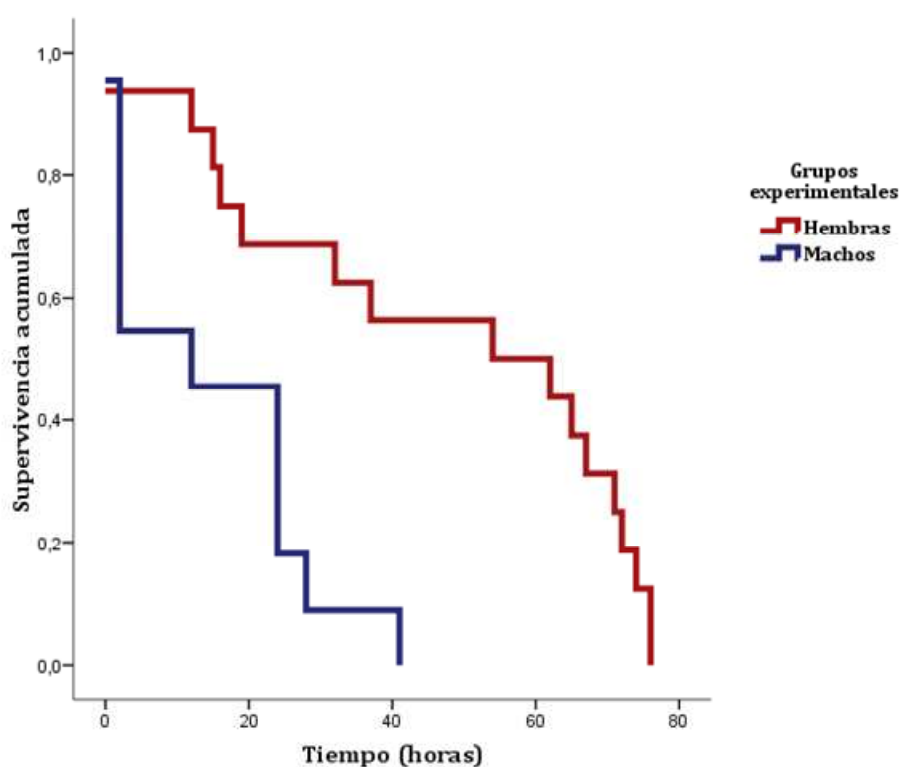
**Tabla 39.** Parámetros de función inmunitaria y estado redox de leucocitos peritoneales procedentes de ratones C57BL6/129, a las 0, 2 y 24 horas, tras la inyección de 50 mg/kg de LPS, en animales machos y hembras.

Parámetros	Unidades	Machos			Hembras		
<i>Función inmunitaria</i>		Tiempo			Tiempo		
		0 horas	2 horas	24 horas	0 horas	2 horas	24 horas
<b>Macrófagos</b>							
Quimiotaxis	I.Q	224±17	232±14	141±10***##	250±10	379±30***c	334±41***c
Fagocitosis <i>Índice fagocítico</i>	I.F	223±39	614±20***	542±9***	570±49c	717±48**	803±32**c
<i>Eficacia fagocítica</i>	E.F	65±2	69±2	82±2***	68±2	64±1	67±1c
Capacidad digestiva celular	nmoles/10 <sup>6</sup> cél						
<i>Basal</i>		24±6	15±2	15±1	72±9c	59±7c	16±2***###
<i>Estimulado</i>		53±7••	25±3***	18±2***	124±22••c	68±11***c	27±2***###
<b>Linfocitos</b>							
Quimiotaxis	I.Q	362±30	554±14***	429±40	508±27b	729±22***c	643±41***c
<i>Basal</i>	c.p.m	1193±73	894±87	977±33	1460±109	2424±230***c	1054±34###
Linfoproliferación <i>Con A</i>	c.p.m	4965±396•••	2166±119***•••	2438±145***•••	4583±281•••	2421±229***	2610±186***••
<i>LPS</i>	c.p.m	10921±884•••	6805±265***•••	5322±505***•••	10065±434•••	5853±301***•••	4608±479***•••
Actividad natural killer (NK)	%	41±7	54±8	32±4	59±10	24±4**a	57±4##b
<b>Estado redox</b>							
<b>Antioxidantes</b>							
Glutación total (GSH)	nmoles/10 <sup>6</sup> cél	1,14±0,08	1,56±0,17	0,93±0,12*#	1,51±0,17	1,88±0,25	2,24±0,21***c
Catalasa (CAT)	U.I cat/10 <sup>6</sup> cél	99±16	91±8	86±5	95±10	71±9	36±6***c
<b>Oxidantes</b>							
Anión superóxido extracelular	nmoles/10 <sup>6</sup> cél						
<i>Basal</i>		7±3	1±0,21***	2±0,28*	26±2c	37±1***c	42±1***#c
<i>Estimulado</i>		11±2	18±4***•••	17±3*•••	21±2b	45±1***•c	45±0,4***c
Xantina	mU.I/mg prot	3,35±0,14	3,25±0,06	3,4±0,11	1,11±0,13c	2,42±0,14***b	2,53±0,21***a

Cada dato representa la media ± error estándar de 27 ratones (hembras) y 18 (machos), de los parámetros realizados por duplicado. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 0 horas. ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  con respecto al correspondiente valor a las 2 horas. •  $P < 0,05$ , ••  $P < 0,01$ , •••  $P < 0,001$  con respecto a la condición basal (capacidad digestiva celular, anión superóxido extracelular y la linfoproliferación). a  $P < 0,05$ , b  $P < 0,01$ , c  $P < 0,001$  con el correspondiente valor de ratones machos.

### Supervivencia

En la figura 85 se representa *la supervivencia* de los ratones C57BL6/129 machos y hembras viejos tras la administración de la dosis de LPS (50 mg/kg). Se observó, que el grupo de hembras tuvo una supervivencia mínima y máxima de 12 y 76 horas, respectivamente, con una supervivencia media de 47 horas. La supervivencia mínima y máxima de los machos fue de 9 y 41 horas respectivamente, con una media de 15 horas. El test de *Kaplan-Meier* revela diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Log Rank [Mantel-Cox]= 0,001).



**Figura 85. Curvas de supervivencia en horas, tras la inducción de un shock endotóxico (50mg/kg) en ratones C57BL6/129 viejos.** Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental.



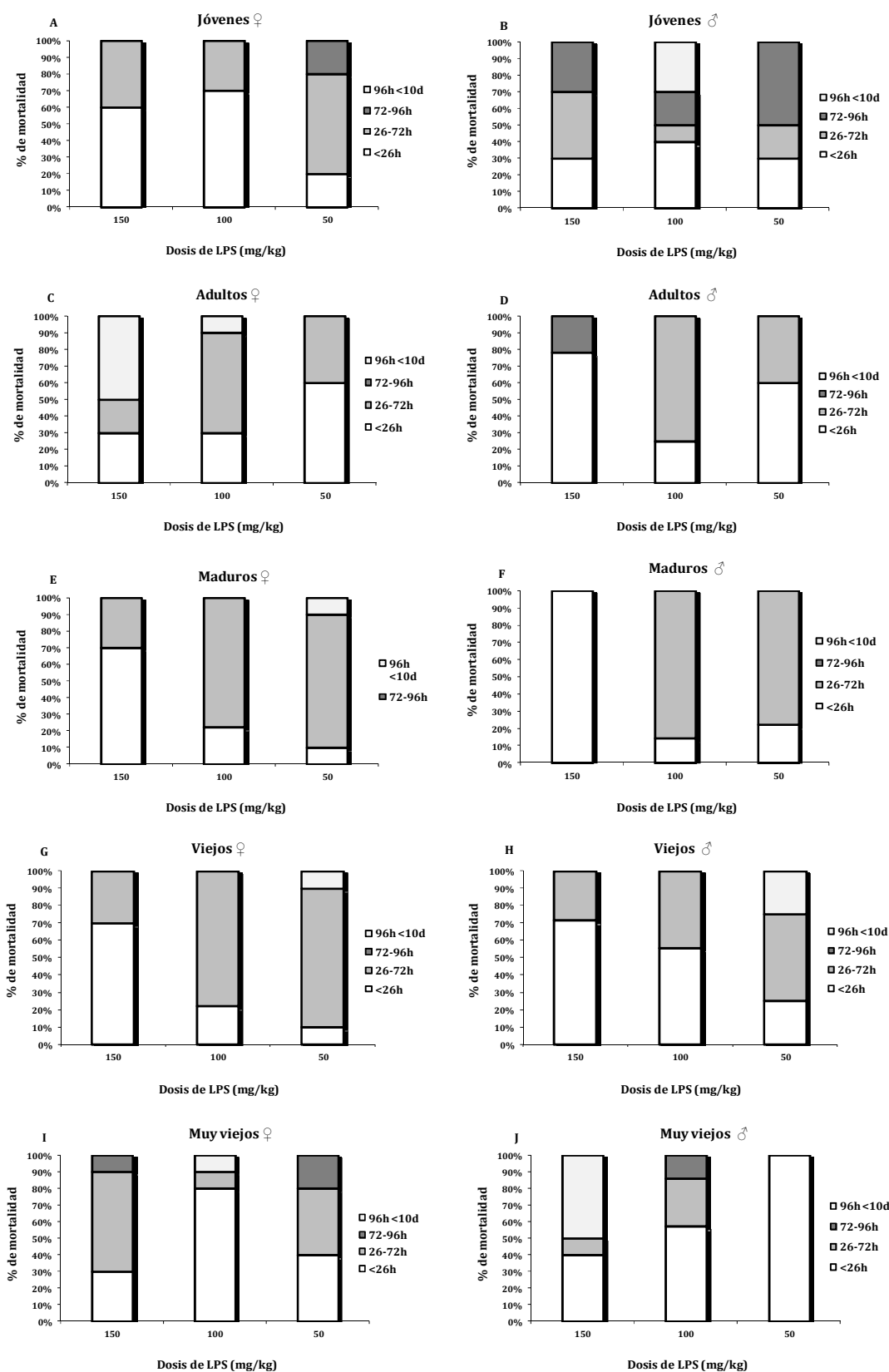
#### 4.5.1. Supervivencia de ratones C57BL6/129, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.

Los resultados correspondientes al porcentaje de mortalidad de ratones C57BL6/129 hembras y machos de 12±2 (jóvenes), 28±2 (adultos), 52±2 (maduros), 72±2 (viejos) y 96±2 (muy viejos) semanas de edad, sometidos a la administración de distintas dosis de LPS, se muestran en las figura 86 y en la tabla 40 . Se observó que los porcentajes de mortalidad tanto de machos como hembras con la dosis de 50, 100 y 150 mg/kg de LPS, fueron altos tanto a <26 y 26 a 72 horas, y más acusados en los machos adultos, maduros y viejos y muy viejos, y en el caso de hembras en jóvenes en un espacio de tiempo de <26 a 96 horas. En los grupos jóvenes y maduros, sometidos a una dosis de 25 mg/kg de LPS, se apreció un aumento de número de animales que mueren entre las 26 y 72 horas en el grupo de maduros tanto hembras como machos, mientras que los jóvenes sucumben a la acción de la endotóxina entre las 96 horas y menos de diez días (tabla 40).

**Tabla 40.** Número de ratones C57BL6/129 machos y hembras jóvenes y maduros que murieron, tras la inyección de 25 mg/kg de LPS.

Tiempo (horas)	Grupo experimentales			
	Joven		Maduros	
	12±2 sem		52±2 sem	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<26h	2	2	0	3
26-72h	2	1	6	6
72-96h	1	5	0	0
96h <10d	5	2	4	1

Cada dato representa el número de animales que sucumbieron en relación a distintas dosis administradas de 50, 100, 150 mg/kg de LPS y tiempo en horas.



**Figura 86. Porcentaje (%) de mortalidad de ratones C57BL6/129, tras la administración de distintas dosis de LPS, en hembras y machos jóvenes, adultos, maduros, viejos y muy viejos.** Cada columna representa el porcentaje indicativo del número de animales que murieron tras la administración de 50, 100 y 150 mg/kg de LPS.

## *Discusión*

---

## **5. Dicusión**

El shock endotóxico es uno de los problemas clínicos más importante a nivel mundial, por ser una condición muy común en pacientes hospitalizados y debido a la elevada tasa de mortalidad y de costo hospitalario que produce (Martins *et al.*, 2003; Elixhauser *et al.*, 2011). El shock endotóxico o septicemia, es considerado como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica grave causada por bacterias o por toxinas bacterianas (Dellinger, 2003; Elixhauser *et al.*, 2011; Dellinger *et al.*, 2013), en el que las células inmunitarias tienen un papel fundamental en respuesta a las mismas, concretamente a la endotoxina. En esta respuesta las células inmunitarias, producen una excesiva liberación de mediadores pro-inflamatorios (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 e IL-8) y compuestos oxidantes (ON, ONOO $^-$ , O $_2$  $^-$  y XO), provocando una disfunción multiorgánica (MOD) (Cohen, 2002; Angus *et al.*, 2001; Víctor *et al.*, 2004; Annane *et al.*, 2005). Por ende, nos encontramos ante un escenario que implica una respuesta exacerbada del sistema inmunitario, y en la que muchas de sus funciones se encuentran altamente comprometidas, lo cual induce una reacción potencialmente fatal en el organismo (Balk, 2004; Matsuda y Hattori, 2006; Mayer *et al.*, 2013). Uno de los grupos más vulnerables de padecer este cuadro clínico, son los individuos de edades avanzadas, que han sido subestimados en varios estudios clínicos sobre sepsis por considerarse de menos interés, que la población más joven. Estos pacientes mayores, además, presentan una inmunosenescencia que subyace a un aumento de susceptibilidad a la infección, con peores respuestas orgánicas (Saito *et al.*, 2003; Umberger *et al.*, 2015). Dada la mayor tasa de mortalidad encontrada en estos pacientes y que con frecuencia desencadena un MOD, actualmente se ha

aumentado el interés por la identificación temprana y tratamiento de la sepsis en este grupo de pacientes (Umberger *et al.*, 2015).

Desde esta perspectiva, y conociendo los cambios que experimenta el sistema inmunitario al envejecer, en la presente tesis se ha estudiado, utilizando un modelo de shock endotóxico en ratones mediante la administración i.p diferentes dosis de LPS (fundamentalmente la dosis de 50 mg/kg), los cambios que experimentan varias funciones y parámetros de estado oxidativo de las células inmunitarias peritoneales (principalmente macrófagos y linfocitos). Así mismo, también se ha comprobado los efectos de esa administración sobre la supervivencia de los ratones. También se ha estudiado como la utilización de estrategias que mejoren la respuesta inmunitaria, como la ingestión de dietas suplementadas con antioxidantes tiólicos (N-acetilcisteína y tioprolina) podrían modificar los parámetros analizados y si estos cambios eran diferentes dependiendo de la edad de los ratones. Además, se ha investigado por primera vez que efectos podría tener un nuevo tipo de estrategia como es la hormesis, en este contexto. Seguidamente se discutirán los resultados correspondientes a cada uno de los objetivos planteados.

### **5.1. Cambios en parámetros de función y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras adultas, maduras, viejas y longevas, así como de la supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*.**

En este primer objetivo, lo primero que se abordó fue el estudio en ratones hembras ICR-CD1 de 36±2 (adultas), 52±2 (maduras), 84±2 (viejas) y 122±2 (longevas) semanas de edad, que recibieron una dosis i.p 50mg/kg de LPS. El

estado funcional y de estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales fue analizado a las 0 (previo a la inyección de endotoxina), 2 y 24 horas tras la inyección de LPS. Esto fue viable gracias a utilizar leucocitos peritoneales, que a pesar de presentar limitaciones en lo que respecta al número de células que se pueden obtener en cada extracción, permite estudiar en cada ratón los cambios a lo largo del shock. Las funciones analizadas han sido previamente establecidas como buenos marcadores del estado de salud, y se conocen sus modificaciones tanto en el envejecimiento cronológico como prematuro (Guayerbas y De la Fuente, 2003; Puerto *et al.*, 2005; Viveros *et al.*, 2007; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2014; Mate *et al.*, 2014a).

La capacidad de migración celular, función inicial en la respuesta inmunitaria (Doherty *et al.*, 1987; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Ley *et al.*, 2007), puede llevarse a cabo tanto de forma espontánea como, y más activamente, a favor de un gradiente de factores químicos atrayentes que provienen del foco infeccioso o inflamatorio (quimiotaxis).

La **capacidad de quimiotaxis** de macrófagos y linfocitos peritoneales, es una función que disminuye al envejecer, hecho observado en trabajos previos en ratones con envejecimiento prematuro (Guayerbas *et al.*, 2003; Vida y De la Fuente, 2013), en ratones ICR-CD1 a lo largo de la edad (Arranz *et al.*, 2010). Así mismo, disminuyen con la edad en neutrófilos y linfocitos de sangre periférica (Di Lorenzo *et al.*, 1999; Ginaldi *et al.*, 1999; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). Esta disminución parece mostrar en una menor respuesta quimiotáctica leucocitaria (frente a factores quimiotácticos derivados

del complemento y a péptido formilado) en la vejez lo que parece ser debida a que estas células sufren un deterioro con el envejecimiento en sus mecanismos de transducción de señales (Fülop, 1994; Fulop *et al.*, 2004). También, esta disminución de la capacidad de quimiotaxis al envejecer, puede ser debida a una respuesta anormal de citoquinas del tipo Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-10) (Sandmand *et al.*, 2002), las cuales inducen la liberación del factor inhibidor de la migración (MIF), citoquina pro-inflamatoria con funciones importantes en el reclutamiento de leucocitos, especialmente en cuadros inflamatorios que aparecen con la edad (Calandra y Bucala, 1997; Klasen *et al.*, 2014; Sauler *et al.*, 2015). En este proceso participa la vía ZAP-70 a través del acoplamiento de CXCR4 y CD74, podría verse implicada en el incremento o disminución de la migración celular de fagocitos, linfocitos T, linfocitos B y fibroblastos (Lue *et al.*, 2011; Klasen *et al.*, 2014). Además, es capaz de generar un incremento del TNF $\alpha$ , hecho que finalmente, produce una retroalimentación continuada, induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (tales como, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aumento de la adhesión e inhibición de la quimiotaxis (Calandra y Bucala, 1997; Matsuda y Hattori, 2006; Flaster *et al.*, 2007; Leng *et al.*, 2009). Otras quimioquinas que participan en el tráfico linfocitario IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , como la expresión de sus receptores (CCR1, CCR3 y CCR5), se encuentran disminuidos en individuos viejos, lo que podría suponer la disminución I.Q observado en este grupo de edad (Middleton *et al.*, 1997; Mariani *et al.*, 2001, 2002). Parece ser que con la edad, el contenido de colesterol de la membrana plasmática de los linfocitos T aumenta (Fülop *et al.*, 2001; Douziech *et al.*, 2002), lo que lleva a una menor fluidez y un aumento en la rigidez de ésta en animales viejos (Fulop *et al.*, 2004; Izgüt-Uysal *et al.*, 2004). Este hecho podría explicar, en parte, la dificultada capacidad de

migración encontrada en leucocitos de animales al envejecer. Sin embargo, los animales longevos muestran esta función de quimiotaxis bien preservada, hecho que ha sido descrito previamente en linfocitos y neutrófilos humanos (Francheschi y Bonafe, 2003; Puerto *et al.*, 2005; Alonso-Fernández, 2006; Alonso-Fernández *et al.*, 2008), y en células inmunitarias del peritoneo de ratones (Arranz *et al.*, 2010a). Esto indica que los individuos que alcanzan gran longevidad mantienen preservada los mecanismos implicados en la respuesta de quimiotaxis leucocitaria.

Tras la inyección de 50 mg/kg de LPS, se observó un aumento significativo en quimiotaxis de las células inmunitarias de animales adultos. Estos resultados han sido observados en otros estudios llevados a cabo con ratones adultos, en modelos de sepsis con CLP (Spite *et al.*, 2009) y con inyecciones subcutánea con LPS (Ariga *et al.*, 2014). Diversos trabajos han demostrado que durante los procesos infecciosos, el LPS liberado de los microorganismos desencadena un amplio espectro de actividades biológicas, tanto en células inmunitarias como no inmunitarias provocando una exacerbada respuesta sistémica (Bishop, 2005; Raetz y Whitfield, 2002). Dentro de esta respuesta está la activación de la osteopontina (sOPN) y su receptor, que ejercen una inducción de la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos en las primeras horas de la endotoxemia (Inoue y Shinohara, 2015). También, la proteína HMGB1 también es un reconocido mediador de esta función durante los cuadros de sepsis, siendo inducida por el TNF- $\alpha$  y la IL-1, y a su vez, HMGB1 potencia la expresión de estas citoquinas por lo que actuaría como un mecanismo de retro-alimentación positiva, y por ende puede generar una amplificación de la respuesta pro-inflamatoria (Andersson *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2015; Opal y Van der Poll, 2015; Huebener *et al.*, 2015). Esta respuesta,



característica de la fase *hiperdinámica* en sepsis, se manifiesta con una respuesta inflamatoria hiperactiva que involucra respuestas celulares y humorales, donde las células endoteliales, epiteliales, neutrófilos, macrófagos y linfocitos, al producir mediadores pro-inflamatorios (TNF $\alpha$ , IL6, IL1 e IL8), facilitan la adhesión de leucocitos, la migración celular y la activación de la cascada de complemento (C3a y C5a) (Mayer *et al.*, 2013). Otros autores indican que el aumento de la permeabilidad vascular que aparece en cuadros de sepsis (Mayer *et al.*, 2013), se relaciona con el reordenamiento del citoesqueleto y los complejos de unión (Milam y Parikh, 2015) y con la acción de la angiopoyetina (Angpt-1, Angpt-2) que interaccionan con el receptor Tie-2 expresado en el endotelio vascular, y que podrían participar en el aumento de la migración celular (Kasa *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2015).

Todo lo indicado podría explicar el aumento de la quimiotaxis que se ha encontrado en la presente tesis al administrar 50 mg/kg de LPS en animales adultos. No obstante, las adultas que recibieron la dosis de 100 mg/kg de LPS, manifestaron una respuesta disminuida de la quimiotaxis que fue significativa a las 24 horas. Este resultado es coincidente con el obtenido en ratones Swiss y BALB/c con shock endotóxico letal por una dosis similar de LPS (Victor *et al.*, 1998; Victor y De la Fuente, 2000; Victor *et al.*, 2002; Victor y De la Fuente, 2003). Esta respuesta disminuida podría deberse a la participación de mediadores solubles críticos durante el curso clínico del shock, como es el factor migratorio inhibitorio de macrófagos (MIF), el cual es inducido por glucocorticoides y tiene como función regular los efectos anti-inflamatorios de éstos, promoviendo la translocación nuclear del NF-kB y de ese modo promover la transducción de citoquinas pro-inflamatorias en sepsis (Flaster *et al.*, 2007; Dickerhof *et al.*, 2015). De hecho, el

papel de MIF en la supervivencia tras la sepsis es fundamental, como se ha comprobado al bloquearlo con anticuerpos en modelos murinos, con shock séptico en animales *knockout* para MIF. En esos casos tiene lugar un incremento en la supervivencia tras el reto endotóxico con LPS. Por su parte, los en pacientes sépticos que muestran niveles elevados de MIF parecen tener peor pronóstico y mayor riesgo de sucumbir a la muerte (Bozza *et al.*, 1999; Calandra *et al.*, 2000, Bozza *et al.*, 2004; Brenner *et al.*, 2010; Brenner *et al.*, 2010a). Otros estudios de sepsis, con ratas lesionadas con quemaduras, mostraron una inhibición en la migración de sus neutrófilos (Kurihara *et al.*, 2013), como en pacientes sépticos graves que muestran una marcada reducción en la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos en comparación con sujetos sanos. Los mecanismos de este fallo en la migración de neutrófilos no se entienden completamente, pero, se sabe que está implicada la activación de los receptores Toll-like (TLRs) por bacterias y sus productos, dando lugar a niveles excesivos de citocinas y quimioquinas circulantes. Estos mediadores que actúan junto con LPS estimulan la expresión de iNOS que produce grandes cantidades de NO, que a su vez media la insuficiencia de la migración celular (Alves-Filho *et al.*, 2008; Kovach y Standiford, 2012), lo que afectaría al tiempo que necesitan las células para alcanzar el foco de la infección, y por lo tanto, permitiría al microorganismo expandirse más fácilmente, estableciéndose la infección. Otros mecanismos que contribuirían en una regulación negativa para esta función, es la respuesta inmunosupresora durante los cuadros de sepsis, que contribuyen a la inducción de la apoptosis en poblaciones linfocitarias, células dendríticas y fagocitos; estas alteraciones funcionales conllevaría a una baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, particularmente HLA-DR, y la alteración en la

capacidad de secretar citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , y por ende se refleja una anergia de la migración celular de los linfocitos (Wang y Deng, 2008).

La respuesta divergente apreciada entre las adultas que recibieron la dosis de 50 y 100 mg/kg de LPS, podría deberse a la carga bacteriana diferente. De hecho, dependiendo de la cantidad de LPS, la cascada de señalización celular que se activa vía CD14 pueden variar (El-Salmouti *et al.*, 1997), hecho observado en estudios con exotoxinas de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Marrack y Kepler, 1990; Welch *et al.*, 1995; Lala y Raja, 1995) Así, en ratones carentes de LBP, presentan menos sensibilidad a LPS (Jack *et al.*, 1997), ya que la unión LPS-LBP ejerce una fuerte participación vía CD14 para provocar la inducción de macrófagos frente a los derivados bacterianos (Marasco *et al.*, 1984; Wyant *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 1999; Yipp *et al.*, 2002) y podrían tener en parte, una esencial participación en la respuesta inmunitaria durante la endotoxemia, que se podría reflejar en la que se está considerando, la quimiotaxis. Muchas pueden ser las causas que podrían estar implicadas en la disminución o aumento de la quimiotaxis dependiendo de la cantidad de LPS que administra al ratón adulto. Los productos bacterianos, las citocinas, como el TNF- $\alpha$ , las quimiocinas, los TLRs, los cambios en el citoesqueleto, los que experimentan otras células inmunitarias como PMN, las interacciones de las células con el endotelio, o las micropartículas circulantes liberadas en la sepsis que ejercen importantes efectos inmunomoduladores de la quimiotaxis a través de ICAM-1, y de la activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), con la consecuente producción la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e inducir la expresión de la señalización desregulada de los receptores celulares (Barry *et al.*, 1997; Barry *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 1999; Reddy y Standiford, 2010; Reid y Webster; 2012).

Los ratones cronológicamente viejos que recibieron las dosis de 25 y 50 mg/kg de LPS, manifestaron un aumento de la quimiotaxis a las 2 horas que desaparece a las 24 horas. Este aumento reflejado a las 2 horas, podría explicarse por la producción y liberación temprana y elevada del TNF $\alpha$  en endotoxemia (Mansilla *et al.*, 1997; Woltmann *et al.*, 1998; Cohen, 2002; Victor y De la Fuente, 2003), y considerada el principal medidor de los efectos del shock (daño vascular, coagulopatía, MOD y la muerte) (Mardaway *et al.*, 2000; Cohen, 2002; Turnbull *et al.*, 2009). Sin embargo, al transcurrir el shock endotóxico, esta citoquina disminuye (Victor *et al.*, 2000; Victor *et al.*, 2001) lo cual se reflejaría en la menor quimiotaxis a las 24 horas. También el NF-kB, que regula la expresión de un gran número de citoquinas pro-inflamatorias involucradas en la patogénesis del shock endotóxico, podría estar implicado en esa diferente respuesta al envejecer (Manish *et al.*, 2010).

La edad madura representa un cambio en muchos procesos desde su estado en adulto a la vejez y esto se aprecia en la disminuida respuesta de quimiotaxis que se observó tras la administración de 50 mg/kg de LPS. En lo que respecta a los ratones longevos que recibieron 50 mg/kg de LPS, los mismos manifestaron unos cambios en la quimiotaxis similares a las de las adultas, ya se indicado que esta función se encuentran preservada en animales longevos y en nonagenarios y en centeanrios (Puerto *et al.*, 2005; Alonso-Fernández *et al.*, 2006; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a; Maté, 2015). No obstante, no se ha encontrado estudios en que respecta a los cambios con un shock endotóxico.

La **migración espontánea** de los leucocitos, esto es, la que realizan en un ambiente carente de gradiente quimioatrayente, disminuye con la edad,

observándose en el grupo de animales viejos los menores niveles de esta función. De hecho, hay estudios que indican que la alteración con la edad en la expresión de los receptores en la transducción de señales en la inmunidad innata conduce a una migración celular defectuosa (Solana *et al.*, 2012). De hecho, se ha descrito que, a edades mayores, aparece una migración imprecisa de los neutrófilos de sangre periférica (Sapey *et al.*, 2014). También, se ha propuesto que la menor migración de los fagocitos estaría asociado a la menor fosforilación debida a la alteración de la actividad de fosfoinositol 3-kinasa (PI3K)(Martins *et al.*, 2003; Hazeki *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2010).

Tras la administración de la endotoxina (50mg/kg de LPS), la movilidad espontánea aumenta claramente en las células de adultos, y también a las 24 horas en viejos. En animales viejos con 24 mg/kg de LPS produce también un aumento de la movilidad espontánea, al igual que a 100 mg/kg de LPS en los adultos. Podría deberse este aumento a la activación del CD14 receptor del LPS y con gran implicación en la migración celular. De hecho en animales con CD14 alterado muestran una disminución de la migración celular (Chchannaoui *et al.*, 2005; Halmer *et al.*, 2015). Un hecho evidenciado recientemente, es la correlación de la migración espontánea (en ausencia de factores quimiotácticos) y la aparición de sepsis (Jones *et al.*, 2014). Un estudio reciente ha mostrado que el tratamiento con mediadores lipídicos ayudan a restaurar el fenotipo normal de migración de neutrófilos, mejorar la supervivencia de sepsis en un modelo animal (Kurihara *et al.*, 2013).

Uno de los pasos importantes después de la migración celular es la **capacidad de ingestión** de partículas extrañas y la digestión de éstas, por parte de

los fagocitos (macrófagos en el caso de la presente tesis), lo que les permite completar el proceso fagocítico una vez alcanzado el foco infeccioso. En lo referente a esta capacidad de fagocitosis, valorada como el número de macrófagos que son capaces de fagocitar (eficacia fagocítica, E.F), así como el número de partículas que fagocitan (índice fagocítico, I.F), la misma disminuye con la edad, lo que resulta coincidente con lo observado en estudios previos acerca de esta función tanto en ratón como en humano (Niwa *et al.*, 1989; Guayerbas *et al.*, 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Arranz *et al.*, 2010a). En la función fagocítica como sucede con otras funciones inmunitarias, existen controversias sobre los cambios que experimentan al envejecer. De este modo, hay trabajo anteriores que revelan que puede estar preservada con la edad, mientras que otros muestran disminución o incluso aumento (Lord *et al.*, 2001; De la Fuente, 2002; De la Fuente *et al.*, 2004; Stout y Suttles, 2005; Aw *et al.*, 2007). Una posible explicación a tales resultados contradictorios en la gran heterogeneidad, tanto funcional como fenotípica que tienen los macrófagos. La proporción de M1 o M2 que se tengan al avanzar la edad como consecuencia de la adaptación de estas células a los cambios del microambiente en el que se encuentren puede modificar su funcionalidad (Stout y Suttles, 2005; Linehan *et al.*, 2014; Fulop *et al.*, 2015). Así, el aumento de las células B peritoneales en ratones viejos, podrían ejercer un impacto importante en la función de los macrófagos (Popi *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2010). No obstante, en la mayoría de los estudios se aprecia que al avanzar la edad disminuye esta función (De la Fuente *et al.*, 2001; De la Fuente *et al.*, 2004; Mate, 2015). Sin embargo, en ratones esta función se encuentra preservada, mostrando valores más similares a los encontrados en animales adultos, hecho que ha sido

previamente descrito tanto en macrófagos peritoneales (Arranz *et al.*, 2010) como en neutrófilos de centenarios (Alonso- Fernández *et al.*, 2008).

Cuando se analiza la E.F y el I.F tras la inyección del LPS, se observó un aumento en todos los grupos de edad que recibieron la dosis de 50 mg/kg de LPS, con valores máximos en los grupos de edad adulta y longeva. Resultados similares fueron observados en ratones adultos con shock endotóxico letal (Víctor *et al.*, 1998; Víctor y De la Fuente, 2000; Víctor y De la Fuente, 2003). La interacción del LPS con los macrófagos parece activarlos a nivel de esta función fagocítica, y no sólo en cuanto al número de partículas que ingieran, sino también a nivel del número de macrófagos que lo hacen para responder ante la endotoxina. Esta activación podría deberse a los altos niveles de citoquinas como el TNF $\alpha$  y la IL-1 que se producen durante los cuadros de shock endotóxico (Sriskandan *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2006; Novotny *et al.*, 2012; Hirsiger *et al.*, 2012; Lasklo *et al.*, 2015). De hecho, se ha relacionado al TNF $\alpha$  con la mayor capacidad de ingestión (Ousman y David, 2001; Bellisai *et al.*, 2012). Además, la activación tras la estimulación por el LPS de los TLRs de la proteína SIRP $\alpha$ , miembro de la familia SIRP que se expresa abundantemente en los macrófagos, y que ha sido implicado en la regulación de las vías de señalización de MAPK y NF-kB, parece estar implicada en la fagocitosis de los macrófagos (Chi *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007). Sin embargo, el grupo de adultas que recibieron la dosis de 100 mg/kg de LPS no mostraron ese aumento del I.F, por el contrario obtuvieron una disminución significativa de dicho índice, aunque no manifestaron cambios con la E.F. Esas diferencias pueden deberse a muchas causas, entre las que se pueden volver a citar algunas de las anteriormente comentadas en la función de quimiotaxis (Marasco *et al.*, 1984; Wyant *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 1999; Yipp *et al.*, 2002; Flaster *et al.*, 2007; Dickerhof *et al.*, 2015).

En la vejez, de darse un aumento también en la respuesta fagocítica (I.F y E.F) tras la administración de la endotoxina (50 mg/kg de LPS), es un aumento menor que el observado en los otros grupos de edad. Esta menor respuesta ante la endotoxina, podría deberse a la generación de un proceso inflamatorio mal regulado tras la infección, con alteraciones a niveles de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, de otros factores implicados (Jak-STAT, SHIP-1; TRIF y dependiente My88), de receptores como el CD16 y vías de señalización como el transporte de calcio, PI3K, MAP quinasas (MAPK) y GM-CSF, que se encuentran modificados al envejecer (Tateta *et al.*, 1996; Butcher *et al.*, 2001; Opal *et al.*, 2005; Wessels *et al.*, 2010; Shalova *et al.*, 2012; Zhan *et al.*, 2014; Cohen *et al.*, 2015; Shalova *et al.*, 2015; Kuethe *et al.*, 2015; Dimitrijevic *et al.*, 2015). De hecho, tras administrar 25 mg/kg de LPS en ratones viejos, se observó una disminución de la capacidad fagocítica, lo que parece indicar que la estimulación de esta función, necesaria para la destrucción del material infeccioso, no tiene lugar apropiadamente en animales viejos. Para completar el proceso fagocítico, los macrófagos proceden a la **digestión del material fagocitado**, la cual se lleva a cabo en gran medida por la producción de agentes oxidantes generados por la activación del sistema NADPH-oxidasas (NOX) (Klebanoff, 1980; Robinson *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 2004). Como ya se ha comentado, el *anión superóxido*, es el primer producto que se origina en la reacción de la NOX, que tiene como sustrato el NADPH<sub>2</sub> y el oxígeno (Belyakovich, 1983).

Los niveles de anión superóxido intracelular, las vertidas al fagosoma para intervenir en la digestión del material ingerido, en condiciones de estimulación con las partículas de látex, muestran, en general, una disminución con la edad. Estos resultados demuestran que con el envejecimiento los macrófagos



peritoneales son cada vez menos capaces de destruir de forma efectiva el material ingerido. En lo que respecta a los cambios de esta función con la edad hay resultados controvertidos pues en algunos casos se obtienen aumentos (Ortega et al., 2000; Guayerbas et al., 2002a; De la Fuente et al., 2008; Arranz et al., 2008; Alonso-Fernández et al., 2008; Mate, 2015), mientras que en otros se observa una disminución, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Álvarez et al., 1995; De la Fuente et al., 2001; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente et al., 2004; Alvarado, 2006; De la Fuente y Miquel, 2009). Esta disminución observada en los resultados obtenidos, podría deberse a cambios con la edad en la composición de las membranas que afecta la fluidez de las mismas (Perskin y Cronstein, 1992; Álvarez et al., 1993), la cual alteraría los mecanismos de señalización disminuyendo la capacidad microbicida y producción adecuada de los niveles de  $O_2^-$  (Álvarez et al., 1995; Shaw et al., 2010). Es evidente que una menor cantidad de anión superóxido intracelular en respuesta a un estímulo frente a un patógeno, es negativo para la apropiada digestión del mismo. Sin embargo, los niveles de  $O_2^-$  al administrar la endotoxina, se observó un aumento de los niveles de este radical libre siendo más marcado lógicamente cuando los macrófagos son estimulados con partículas de látex. Los incrementos en el grupo de ratones adultos son coincidentes con los observados en trabajos previos con shock endotóxico letal (Victor et al., 1998; Victor y De la Fuente, 2000; Victor et al., 2002; Victor y De la Fuente, 2003). Esto es consecuencia del aumento en el estallido respiratorio que desencadena el shock endotóxico para realizar la función micorobicida (Aust et al., 1993; Leach et al., 1998; Park, 2003; Catheart, 2004; Robinson, 2008; Moore y Mackenzie, 2009). También se ha propuesto que la generación elevada de citoquinas pro-inflamatorias como  $TNF\alpha$  y  $IL-1\beta$  es

respuesta al LPS, estaría involucrado con el aumento de  $O_2^-$  (Rosenfeld y Shai, 2006; Bosmann y Ward, 2012; Yamacita-Borin *et al.*, 2015; Serafim *et al.*, 2015). Los adultos que recibieron la inyección de 100 mg/kg de LPS, mostraron una disminución de la capacidad digestiva celular ( $O_2^-$  intracelular), en respuesta a la endotoxina al igual que, como ya se mencionado, disminuyen su fagocitosis. Por lo tanto, la diferente respuesta podría deberse a la distinta carga bacteriana y estado del individuo (Marrack y Kepler, 1990; Welch *et al.*, 1995; Lala y Raja, 1995).

De hecho, las células peritoneal de ratones viejos que frente a 50 mg/kg de LPS muestran una estimulación de los niveles de anión superóxido intracelular (aun que menor que la que presentan la de adultos), con 25 mg/kg de LPS manifiestan una disminución. Estos resultados demuestran que al envejecer las células inmunitarias son menos capaces que destruir de forma efectiva los patógenos que ingieren, coincidiendo con otros resultados (Alvarado, 2006). De este modo, ya con una dosis mínima de LPS, es capaz de producir en esta edad la vejez, un efecto letal. Con lo cual, es un hecho que la respuesta frente a la endotoxina varía en gran medida en función de la edad (Saito y Papaconstantinou, 2001). La disminución de esta capacidad microbicida con la edad podría deberse a muchos factores, como por ejemplo, entre otros, los cambios en la composición de las membranas (Perskin y Cronstein, 1992), lo que dificulta la respuesta efectiva de destrucción en situación de shock endotóxico (Szabo *et al.*, 1997; Cuzzocrea *et al.*, 2001).

En una función de la linfocitos muy representativa de su respuesta frente a los extraños, como es la proliferación, se observó una disminución con la edad, hecho coincidente con numerosos estudios, aunque se observaron especialmente

en la proliferación que tiene lugar frente a los mitógenos, como la *concanavalina A* (estimulo para las células T) y *lipopolisacarido* (estimulo para las células B) (Malaguarnera *et al.*, 2001; Pawelec *et al.*, 2002; Frasca *et al.*, 2003; Stout y Suttles, 2005; Alvarado *et al.*, 2006; De la Rosa *et al.*, 2006; Solana *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2010).

En lo que respecta, a la respuesta tras recibir la administración del LPS, todos los grupos de edad que recibieron la dosis de 50 mg/kg de LPS, mostraron un aumento significativo a las 2 horas tanto a nivel basal como, especialmente en respuesta a los mitógenos utilizados. Sin embargo, a las 24 horas el aumento desaparece e incluso se dio una disminución de esta respuesta proliferativa. Si bien en trabajos previos en ratones adultos se había observado un aumento de la proliferación basal. Tras la administración del un shock endotóxico letal con 100 mg/kg de LPS, la proliferación en respuesta a Con A apareció disminuida (Victor y De la Fuente, 2003) lo que, al menos a las 2 horas no resulta coincidente con los resultados de la presente tesis. El aumento proliferativo detectado a las 2 horas tras la administración de LPS en el presente estudio podría deberse a un aumento en el TNF $\alpha$ , citoquina implicada en la producción de IL-2, necesaria para la proliferación y que se libera en los primeros momentos del shock (Mathew y Sharma, 2000; Karahashi y Amano, 2000; Goodier y Londei, 2000; Víctor y De la Fuente, 2003a; Cunnen *et al.*, 2004; Sriskandan y Altmann, 2008; Turnbull *et al.*, 2009). Otros grupos también han sugerido la participación de la células natural killer, en la producción de altas cantidades de citoquinas como el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que podrían contribuir en la regulación de la respuesta proliferativa (Víctor y De la Fuente, 2003a; Cooper *et al.*, 2001; Goldmann *et al.*, 2005; Chiche *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2014). De este modo, se podría dar una activación inmediata de retro-

alimentación positiva y amplificación de la respuesta pro-inflamatoria para responder en las primeras horas de la infección (Rosenfeld y Shai, 2006; László *et al.*, 2015). No obstante, la disminución observada a las 24 horas tras recibir la endotóxina, podría ser ocasionada por el proceso de inmunorregulación que ocurre durante el proceso séptico, que modularía la respuesta proliferativa de manera diferente tras las primeras tras un shock. Si bien una determinada cantidad de LPS podría estimular en un primer momento la respuesta de radicales libres y de citoquinas pro-inflamatorias, mediadores implicados en un aumento de la proliferación linfóide, posteriormente serían otros los compuestos liberados para intentar contrarrestar la oxidación e inflamación. Así, otras citoquinas, más anti-inflamatorias, o el aumento de células Treg podrían incidir para que la respuesta proliferativa disminuyera tras los momentos de la respuesta al shock (Bone *et al.*, 1997; Zeni *et al.*, 1997; Hotchkiss *et al.*, 2003; Von Boehmer, 2005; Campell y Ziegler, 2007; Campell *et al.*, 2007; Monneret *et al.*, 2008; Van der Poll y Opal, 2008; Venet *et al.*, 2009; Strober y Fuss, 2011). Otros mecanismos y factores involucrados en la disminución de la respuesta proliferativa son las moléculas de histocompatibilidad clase II, la disminución de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  y la producción de las anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10, el receptor soluble del TNF, TGF- $\beta$ , y el receptor sustituto de IL-1 tipo II (Wang y Dent, 2008; Ginde *et al.*, 2014; Albertsmeier *et al.*, 2014).

A pesar que los animales viejos, tanto con la dosis de 25 como de 50 mg/kg de LPS, muestran una respuesta similar a la de los ratones de las otras edades, su respuesta a los mitógenos (ConA y LPS) es algo menor. Actualmente, las diferencias relacionadas con la edad durante el shock han sido estudiadas durante la fase aguda de la sepsis, donde se indica que los individuos mayores pueden

tener afectado los niveles de CCL-23, IL-1ra, NGAL y TNFR-1a, TNF $\alpha$ , lo que coincide con el declive del factor de crecimiento autocrino de células T (Guayerbas *et al.*, 2002a; Pawelec *et al.*, 2002; De la Fuente, 2008b). Aunque hay trabajos que indican que en la vejez esas moléculas están elevadas (Ginde *et al.*, 2014), lo que podría explicar el aumento de la proliferación a las 2 horas que muestran también la células de los animales viejos, lo que parece ser aceptado con la desregulación con la edad en la de la producción de citoquinas y función celulares que afectaría a la respuesta al LPS. Esta desregulación de la citoquinas, puede ser debida al aumento de la apoptosis de la células B y T, causa obvia de la pérdida de la función de estas células (Takahashi *et al.*, 2012). De hecho, en ratones durante el curso de la sepsis muestran una pérdida sistémica y significativa de las células dendríticas (CDs) de los nódulos linfoides, y que tal pérdida ocurre después de la apoptosis de los linfocitos T CD3+CD4+ murinos (Sirgo *et al.*, 2010). También se ha demostrado que las CDs de ratones sépticos maduran correctamente, pero son incapaces de secretar IL-12 para inducir una inmunidad eficiente contra las infecciones bacterianas (Flohe *et al.*, 2006). Otro mecanismo que puede estar involucrado, es la participación de las células Treg que regulan la función de linfocitos T CD4+ y CD8+, B, CDs y NK, e inducen la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa, alterando de ese modo la activación eficiente de las células T efectoras, y en consecuencia la linfoproliferación (Von Bohemer, 2005).

Otras de las funciones estudiadas en la presente tesis ha sido la actividad **natural killer**, ya que las alteraciones funcionales de las NK pueden contribuir a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas (Albriht *et al.*, 2004). Esta función, aunque hay resultados contradictorios parece, en general, disminuir con la edad

(Puerto *et al.*, 2005; De la Rosa *et al.*, 2006; De la Fuente, 2008b; De la Fuente *et al.*, 2008; Arnaz *et al.*, 2010a; Mate, 2015).

Una vez administrada la endotoxina, hay un aumento de la actividad natural killer en adultas y longevas, mientras que en las viejas se aprecia solo a la 2 horas y en menor grado que en las otras edades, dándose incluso una disminución a las 24 horas. En el caso de los ratones adultos, los resultados coincide con los previamente obtenidos en nuestro grupo en un modelo con shock endotóxico letal (Víctor y De la Fuente, 2003a). El papel de la actividad NK en la sepsis, resultan controvertidos son contradictorios para explicar de manera clara los resultados obtenidos. Algunos estudios, en modelos murinos, reportan el papel perjudicial de la actividad natural killer durante los episodios de sepsis. Por ejemplo, ratones deficientes en NK, cursan con más resistencia y atenuada respuesta inflamatoria ante el proceso séptico (Sherwood *et al.*, 2004; Enoh *et al.*, 2007). En otros modelos con altas dosis de lipopolisacárido (LPS) se observó que la disminución de las células NK ofrece protección frente al LPS (Heremans *et al.*, 1994; Emoto *et al.*, 2002), dado que la activación de las células NK induce la secreción de citoquinas como INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  que pueden contribuir a desencadenar un cuadro inflamatorio exacerbado que conlleva a la muerte del individuo (Badgwell *et al.*, 2002; Golmann *et al.*, 2005). En oposición, a lo expuesto la amplificación de la actividad natural killer, por medio de la IL-12 (mediada por las CDs) induce la secreción de la citoquina IL-10, revelando la función reguladora NK en los cuadro de infecciones (Perona *et al.*, 2010). Sin embargo, incluso con la disponibilidad de modelos deficiente selectivos de células NK modelos deficientes (Walzer *et al.*, 2007) o de de ratones humanizados (Unsinger *et al.*, 2009), un problema constante en el que insisten los investigadores, es que los estudios de sepsis en roedores son muy

imprecisos siendo los resultados dependientes de la cepa y los modelos de sepsis, y ante la mayor resistencia de estos animales en los modelos de inflamación inducida, en comparación con los seres humanos (Zanotti-Cavazzoni *et al.*, 2009).

En lo que respecta a la menor actividad NK observada en los animales viejos a las 24 horas, una posible explicación podría ser la menor expresión del receptor de membrana CD69 (cuya activación desencadena la actividad citolítica de las células NK) inducida por IL-2 (Borrego *et al.*, 1993) que puede suceder en esa edad. Además, la diferente presencia en la vejez de la subpoblación de NK “inmaduras” y “maduras” (Krishnaraj, 1997) podrían estar influyendo o de la expresión del fenotipo CD56dim o CD56brighth en la NK con diferente respuesta a la IL-2 (Voss *et al.*, 1992; Krishnaraj, 1997; Chinche *et al.*, 2011).

Seguidamente se comentará lo observado en los niveles de oxidación o de defensas antioxidantes valoradas en la presente tesis en el marco de primer objetivo. Para llevar a cabo la adecuada respuesta inmunitaria los leucocitos deben disponer niveles apropiados de ROS, esto significa que si bien elevados niveles de ROS desencadenan un estrés oxidativo que resulta letal para las células y tejidos del organismo, unos niveles muy bajos impiden una adecuada defensa inmunitaria y un buen funcionamiento celular (Yang *et al.*, 2013; Gostner *et al.*, 2013). Hay que tener en cuenta que los niveles de ROS son el resultado de su producción por parte de las células y de su utilización funcional y neutralización por parte de las defensas antioxidantes. Así, existen evidencias de una correlación positiva entre niveles bajos de ROS y mayor actividad bactericida (Boxer, 1995). Por otro lado, algunos autores han descrito que niveles aumentados de radicales libres no presentan un efecto paralelo sobre la función bactericida (Wolach *et al.*, 2000),

mientras que podrían resultar deletéreos para los propios leucocitos y para las células que se encuentren próximas a ellos (Victor y De la Fuente, 2003, De la Fuente, 2008b). En el envejecimiento tiene lugar un estrés oxidativo crónico que afecta a todas las células del organismo, principalmente a la de los sistemas reguladores como el sistema nervioso, endocrino e inmunitario. Esta oxidación progresiva conduce al daño de biomoléculas, que finalmente causa el declive de las funciones fisiológicas asociado a la edad, estando el deterioro de la función inmunitaria, la inmunocenescencia, implicada en la velocidad a la que cada individuo envejece (De la Fuente, 2008b; De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2014).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las defensas antioxidantes, disminuyen en los animales viejos. Así, estos presentan niveles disminuidos de **actividad CAT**. En este sentido, varios trabajos previos demuestran un declive de la actividad catalasa en los leucocitos de ratones viejos y prematuramente envejecidos, lo que respalda el declive de este parámetro con el envejecimiento (Alvarado *et al.*, 2006b). Los **niveles de GSH** aunque no alcanzan diferencias estadísticamente significativa, también se muestran menores en las células de animales viejos, lo que es coincidente con resultados previos en ratones y humanos (Hernanz *et al.*, 2000; Dröge, 2005; Alvarado *et al.*, 2006a; Arranz *et al.*, 2010). Esta disminución que la depleción de GSH parece tener consecuencias en una variedad de funciones leucocitarias, tales como la proliferación de los linfocitos T y la actividad NK (Dröge *et al.*, 1994). Por otro lado, las células de los ratones longevos tienen valores más preservados de ambos antioxidantes, lo que coincide con otras observaciones realizadas por nuestro grupo de investigación también respecto a los niveles de GSH y la actividad catalasa, que resultaron



mayores en los leucocitos de personas centenarias (Alonso-Fernández, 2006; Alonso-Fernández *et al.*, 2008).

En lo que respecta a los compuestos oxidantes, en el presente trabajo se ha valorado los niveles del **anión superóxido extracelular**, el cual está implicado en el daño oxidativo que pueden generar las células inmunitarias a ellas mismas y otras cercanas. Estos niveles, tanto en condiciones basales como estimuladas, aumentan en los animales viejos en comparación con los otros grupos de edad. Resultados similares han sido obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo (Ortega *et al.*, 2000, 2000a, Guayerbas y De la Fuente, 2003; Alvarado, 2006). Una causa posible es el deterioro de las membranas plasmáticas al envejecer, la cuales al disminuir su fluidez como consecuencia de la modificación en la composición lípida que la constituyen (Traverso *et al.*, 2004; Khang *et al.*, 2006), podría facilitar la salida del  $O_2^-$  producido intracelularmente, con el consiguiente riesgo de daño celular adyacente.

Durante la sepsis, tiene lugar un desequilibrio en el sistema redox, lo que lleva a la formación de un estado oxidante, que propicia una respuesta inflamatoria durante las primeras horas (Andrades *et al.*, 2011). En ese contexto, disminuyen las defensas los antioxidantes tales como los niveles de GSH, de selenio, actividad CAT y tiorredoxinas, y aparece un daño oxidativo (Berger y Chiolo, 2007).

En el presente trabajo la administración de 50 mg/kg de LPS estimula la actividad CAT y los niveles de GSH al menos a las 2 horas en adultas. El caso de los niveles de GSH, el aumento, que tiene lugar también a las 24 horas aparece de igual manera en las células de longevos, pero no en los viejos. De este modo, el GSH parece ser una defensa puesta en marcha en situación de shock endotóxico de

individuos con un regulado sistema inmunitario y parece ser indicador de supervivencia. De hecho, resultados previos muestran un aumento de antioxidantes en leucocitos murinos tras el shock endotóxico en adultos (Víctor *et al.*, 2002). En ensayos clínicos de sepsis, adición de glutamina (precursor de GSH) o selenio a los fluidos parenterales nutricionales mejora los resultados clínicos y reduce la intensidad de la sepsis (Beger *et al.*, 2007). El aumento a las 2 horas de la administración del LPS en la actividad CAT, se observa también en adultos y longevos, como en las células peritoneales de las viejas, lo que apunta a que respresenta un intento de compensación antioxidante temprana frente al estrés oxidativo del shock endotóxico, pero en el caso de los animales viejos con 25 mg/kg de LPS. De hecho, con 25 mg/kg los ratones viejos ya muestran una menor actividad de CAT a las 2 horas que es aún menor a las 24 horas, mientras que los adultos con 100 mg/kg de LPS es a las 24 horas que presentan una máxima activación de esta enzima antioxidante. Esto sugiere que puede haber una causa y efecto en relación entre desequilibrio redox, la intensidad de la respuesta séptica.

En línea con esta idea, la administración de antioxidantes (N-acetilcisteína,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C) o la promoción de factores atioxidantes (selenio), se ha asociado con mejoría clínica, junto con una respuesta atenuada SIRS, lo que sugiere un vínculo entre ROS y SIRS (Crimi *et al.*, 2010). Otro factor implicado en la regulación redox es el NF-kB participante central en la expresión de muchos de los mediadores implicados en el estrés oxidativo, presente en la sepsis. De hecho, se ha demostrado una clara relación entre la activación excesiva de NF-kB y el estrés oxidativo (Víctor y De la Fuente, 2003; Zingarelli *et al.*, 2003; Blackwell *et al.*, 2003). La administración de N-acetilcisteína en individuos con shock endotóxico disminuye la sobreactivación del NF-kB (Victor y De la Fuente, 2001; Victor *et al.*,

2003). También una posible causa de la disminución de las defensas antioxidantes en la sepsis, sea la pérdida de traslocación del Nrf2, el cual promueve la inducción de antioxidantes (Zakkar *et al.*, 2009). Los defectos en Nrf2 causados por el exceso de ROS, indicarían un desequilibrio en el sistema redox, favoreciendo a la condición oxidativa, hecho observado en roedores con sepsis (Kong *et al.*, 2011; MacGarvey *et al.*, 2012). De hecho, muchas funciones inmunitarias tales como la fagocitosis, quimiotaxis y la capacidad digestiva resultan inefectivas, por la activación excesiva del estado redox (Scumpia *et al.*, 2005; Sirgo *et al.*, 2010; Ward, 2010; Delano *et al.*, 2011). Efectivamente, los resultados obtenidos en el presente trabajo respaldan una esa respuesta inmunitaria ineficaz al envejecer.

En lo que respecta al compuesto oxidante valorado en los leucocitos peritoneales, el **anión superóxido extracelular**, tanto basal como tras la estimulación con partículas de látex, sus niveles aumentaron a las 2 y 24 horas en respuesta a los 50 mg/kg de endotoxina, en todas las edades. Así como con 25 mg/kg aumentó a las 24 horas en viejos y con 100 mg/kg de LPS también aumento en los adultos. En lo que respecta a los adultos, los resultados obtenidos coinciden con los previamente aportados por nuestro grupo (Víctor y De la Fuente, 2003b). Como ya se ha indicado, para poder ejercer una respuesta inmunitaria ante la endotoxina, es necesaria la producción de ROS y consecuentemente, aumenta la aparición la aparición de radicales libres a nivel extracelular (Víctor *et al.*, 2003). Este hecho en la edad adulta, se encuentra bien regulado por las defensas antioxidantes como se ha comprobado en el presente trabajo. Sin embargo, los niveles acusados de este radical extracelular en los animales viejos, posiblemente consecuencia de las alteraciones que experimentan las células a nivel de las

membranas, no sea bien regulada por el sistema de las defensas antioxidantes al avanzar la edad (Álvarez *et al.*, 2001; Traverso *et al.*, 2001; Khang *et al.*, 2006).

Los desajustes en el estado redox que experimentan las células inmunitarias al envejecer estan en la base de su peor capacidad funcional (De la Fuente y Miquel, 2009. Lo mismo se puede indicar para las células observadas en las células tras la administración de LPS. En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que los leucocitos peritoneales experimentan un importante deterioro con la edad, lo que confirma además respalda trabajos anteriores de nuestro grupo y de otros autores. También ratifican que los individuos que envejecen saludablemente y llegan a alcanzar elevada longevidad, son aquellos capaces de adaptarse y preservar un mejor estado inmunológico. Este adecuado mantenimiento funcional y de estado redox se refleja en los cambios que tienen lugar tras la administración de la endotoxina, y se observa en la supervivencia de los animales. Así, esta supervivencia ante la endotoxina, fue significativamente menor en los animales viejos (con un 100% a las 41 horas). Muchos son los estudios que reportan esta misma respuesta en estudios epidemiológicos y modelos animales de sepsis (Remik *et al.*, 2002; Kellum *et al.*, 2007). Por el contrario, los animales adultos con 50 mg/kg de LPS no sucumbieron a la muerte ante la endotóxina, aunque si lo hacen al aumentarse la dosis a 100 mg/kg de LPS, muriendo a las 48 horas. Por otro lado, las longevas manifestaron una mejor resistencia que las viejas ante el cuadro endotóxico, con una supervivencia de 129 horas, con lo cual respalda como en este grupo de edad, la mejor respuesta inmunitaria y estado redox observada, es muy semejante en casi todos los casos a la de las adultas, se relaciona claramente con la supervivencia. Esta asociación que se observaron con los resultados de la presente tesis ante el cuadro de shock endotóxico, es coincidente

con los encontrados en otros estudios (Dombrovskiy *et al.*, 2007; Ginde *et al.*, 2013). De hecho, en un estudio reciente de sepsis se comprobó que los ratones de edad, en comparación con los jóvenes, tuvieron mayor mortalidad debido en gran parte a la respuesta inmunitaria innata y discapacidad funcional para destruir a los microorganismos, dado que, las respuestas de citoquinas pro-inflamatorias fueron similares en ambas edades (Nacionales *et al.*, 2014).

*Como resumen a todo lo indicado se puede decir que las células inmunitarias manifiestan modificaciones a los largo de edad que suponen una peor funcionalidad de las mismas, lo que se encuentra estrechamente relacionado con la pérdida de su homeostasis redox. Por su parte, los individuos longevos conservan una mejor capacidad funcional y estado redox. Tras la administración del LPS, la respuesta a nivel funcional en aquellos animales que parten de mejores niveles, permite una adecuada activación frente a la cantidad de endotoxina con la que se enfrentan, hecho que se refleja en la mayor supervivencia, como sucede en los ratones adultos y longevos. Esto hace que la cantidad de endotoxina para producir una pronta mortalidad de los animales sea menor al envejecer, pero semejante a la que soportan los adultos en aquellos animales que han llegado a una elevada longevidad*

**5.2. Estudiar las diferencias en las repuestas funcionales y estado redox de las células inmunitarias peritoneales de ratones ICR-CD1 hembras de edad madura, tras la administración de 50 mg/kg de LPS, en animales que sobrevivieron y no al shock endotóxico.**

Una vez analizado el efecto que, sobre distintos parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos peritoneales, tiene la administración de un shock endotóxico en ratones hembras de diferentes edades, y al comprobar que en la

edad madura había una respuesta heterogénea a la dosis de 50 mg/kg de LPS, nos planteamos profundizar en el estudio de este grupo de edad. Para ello, en este segundo objetivo se utilizó un mayor número de ratonas ICR-CD1 maduras ex-reproductoras de  $48 \pm 2$  semanas de edad que las utilizadas en el primer objetivo. Al analizar individualmente a los animales, se pudo dividir los resultados obtenidos en los parámetros de función y estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de aquellas ratonas que sobrevivieron a la administración de los 50 mg/kg de LPS (un 20% del total) de los correspondientes a las que no sobrevivieron (el 80%). Esto permitiría comprobar qué parámetros estaban con valores diferentes en unas y otras antes de administrar el LPS y cómo eran los cambios a las 2 y 24 horas de la administración de la endotoxina en cada uno de esos grupos.

En base al conocimiento previo que se tiene sobre la evolución de la inmunosenescencia en las células peritoneales de esta cepa de ratones, parece vislumbrarse que la edad madura representa una edad crítica de paso de la edad adulta a la vejez, en la que es más claramente apreciable cómo está llevando a cabo cada individuo el proceso de envejecimiento a nivel de los parámetros que se están considerando en la presente tesis (Arranz *et al.*, 2010; Mate *et al.*, 2015). Es por ello una edad clave para encontrar diferencias individuales en el estado funcional y de estrés oxidativo de las células inmunitarias y en su respuesta frente a una infección, lo que se reflejará en la distinta capacidad de los animales a la misma.

Los parámetros funcionales y de estrés oxidativo estudiados son los ya mencionados en el objetivo anterior. En la mayoría de las funciones de macrófagos y linfocitos estudiadas no hay diferencias entre el grupo de supervivientes y no supervivientes antes de la administración de la endotoxina. No obstante sí se

aprecian diferencias en los niveles de *anión superóxido intracelular* en estado basal y en el estimulado por material que se ha fagocitado, siendo este último más indicativo de la capacidad de digestión de los macrófagos. En esta función, en la que se encuentra la vía NADPH-oxidasa (Bosmann y Ward, 2013), las supervivientes mostraron mayores niveles del anión superóxido intracelular que las que no sobrevivieron. Aunque pueda parecer extraño que unos mayores niveles de un radical libre, como lo es el anión superóxido, puedan ser beneficiosos, realmente si estos se dan intracelularmente, en el fagosoma, van a permitir una mejor destrucción del material fagocitado y por tanto esas células estarán mejor preparadas para luchar frente a una infección. Así, esta función, como ya se ha comentado, disminuye al envejecer y en individuos con envejecimiento prematuro, siendo un marcador de edad biológica (De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010; De la Fuente, 2015). Por tanto, las ratonas maduras que sobrevivieron, aun teniendo la misma edad cronológica que las que no lo hicieron, tenían este parámetro como si fuesen más jóvenes, lo que apunta a una edad biológica menor. Otra función en la que se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos es la *linfoproliferación* en respuesta al *mitógeno LPS*. Esta capacidad proliferativa, muy importante en la respuesta inmunitaria, se encuentra más disminuida en las células de los animales que no sobrevivieron. Como al LPS responden proliferando fundamentalmente los linfocitos B, parece que son estos los que se conservan mejor en las supervivientes. Dado que los glucocorticoides disminuyen el número y actividad de estas células (Garvy *et al.*, 1993), y los mismos aumentan en individuos al envejecer y con envejecimiento prematuro, relacionándose sus niveles con el estrés oxidativo y el deterioro inmunológico (Cruces *et al.*, 2014; Vida *et al.*, 2014), esa menor capacidad de los linfocitos B puede deberse a un

aumento de los niveles de corticosterona en los animales que no sobrevivieron, y que consecuentemente se encontraban más envejecidos que los que sí lo hicieron. Sería conveniente, en un futuro, valorar los niveles de esa hormona en el contexto de este diseño experimental.

Tras la administración del LPS, las funciones experimentan cambios similares a los ya comentados en el apartado anterior, los cuales en una serie de funciones como la movilidad espontánea y la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, la fagocitosis y la respuesta linfoproliferativa, no fueron diferentes en los animales que sobrevivieron y en los que no lo hicieron. En el *anión superóxido intracelular*, de nuevo, como sucedió al considerar las diferencias entre los dos grupos antes de la administración de la endotoxina, aparecen valores estadísticamente diferentes entre las que sobrevivieron y las que no lo hicieron, mostrando estas últimas menores niveles de ese radical libre intracelular. No obstante, en esta función, el grupo de animales utilizado para este segundo objetivo, manifestó un comportamiento de cambio al LPS diferente al observado en el primero, en lo que respecta al anión superóxido basal. En este grupo no se han apreciado, de forma estadísticamente significativa, los aumentos de las células correspondientes al primer objetivo. Lo que de nuevo se hace evidente es que menores niveles de generación de este radical libre se relacionan con una mayor mortalidad. En estudios anteriores, en modelos de shock endotóxico en ratones adultos se observó un aumento de los niveles de este radical (Victor *et al.*, 1998; Victor *et al.*, 2000; Victor *et al.*, 2001). Este aumento observado puede ser debido, a la producción de mediadores pro-inflamatorios (citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 e IL-8 y la proteína C-reactiva), que generarían en mayor cantidad los animales que sobreviven y que están implicados en la producción de ROS, permitiendo a las



células fagocíticas una mejor defensa frente a la infección (Lazslo *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2011). En la respuesta *linfoproliferativa* al *mitógeno LPS*, aunque la evolución de la misma tras la administración de la endotoxina fue similar en los dos grupos (supervivientes y los que no sobrevivieron), los valores de proliferación a las 2 horas de la administración del shock fueron mayores en las supervivientes. Parece evidente que esta mayor proliferación frente a un *mitógeno* supone una ventaja en la respuesta inmunitaria de los individuos, y se manifiesta en la supervivencia de los mismos. La *actividad NK*, aunque los animales de ambos grupos parten de valores similares antes de la administración de la endotoxina, tras recibir la misma apareció un comportamiento diferente en los supervivientes, con una mayor actividad antitumoral a las 2 horas, aunque luego disminuya a las 24 horas. Esta diferente respuesta NK parece resultar positiva ya que los animales sobrevivieron a la endotoxina. No obstante, Victor y De la Fuente (2001), detectaron una mayor actividad NK en ratones BALB/c con shock endotóxico irreversible. En otros estudios, en ratones, utilizando altas dosis de LPS, propician una disminución de la actividad NK (Heremans *et al.*, 1994; Emoto *et al.*, 2002). Esta función ha sido objeto de muchas controversias. Si bien algunos investigadores han planteado el papel perjudicial de las NK en diferentes modelos de infecciones bacterianas (Badgwell *et al.*, 2002; Godshall *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2003; Kerr *et al.*, 2005; Sherwood *et al.*, 2004; Etogo *et al.*, 2008), otros apuntan a que una mayor actividad NK permitiría la producción de citoquinas inmunopresoras como la IL-10, que regularían la respuesta inmunitarias (Perona *et al.*, 2010).

En lo que respecta a los parámetros de estrés oxidativo analizados en la presente tesis, la actividad de la enzima *antioxidante CAT* se encontró más elevada

en las células peritoneales de los animales que sobrevivieron, antes de la administración de la endotoxina. Este es el único parámetro, de los analizados de estrés oxidativo, que mostró diferencias en el estado previo a la administración del LPS. De nuevo ese resultado demuestra la menor edad biológica de los animales que sobrevivieron frente a la de los que no lo hicieron, a pesar de su idéntica edad cronológica. En el envejecimiento cronológico y prematuro hay una disminución de la actividad CAT de los leucocitos peritoneales (De la Fuente *et al.*, 2004; De la Fuente, 2008a; 2008b), y también más actividad de esta enzima se ha relacionado con una mayor longevidad de los individuos (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010). Tras la administración de la endotoxina la disminución en la actividad de CAT que tiene lugar, especialmente a las 24 horas, y que también fue observada en los animales del primer objetivo, solo aparece en los que no sobrevivieron. En los animales supervivientes se mantiene la actividad de CAT tras la administración del LPS. No obstante no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. En las variaciones de CAT con el shock existen discrepancias, habiendo autores que indican una disminución mientras otros han descrito aumentos o falta de cambios en su actividad (Frank *et al.*, 1978; Nelson *et al.*, 1991).

En lo que respecta a los niveles del otro antioxidante valorado, *el GSH*, aunque no hubo diferencias entre los grupos antes de la administración de endotoxemia, a las 2 horas de la inyección se produjo un aumento significativo de sus niveles en el grupo de supervivientes, que no tuvo lugar en los que murieron, dándose mayores cantidades a ese tiempo que en este grupo de los no supervivientes. No obstante, previos resultados manifiestan una disminución para el caso de CAT y un aumento de GSH en ratones BALB/c con shock endotóxico

irreversible (Victor *et al.*, 2001d) y en un modelo de ratas con shock endotoxico (Catalá, 2002). Si tenemos en cuenta que en el estado redox hay que considerar tanto cómo se encuentran los compuestos antioxidantes como los oxidantes, al evaluar los niveles de *anión superóxido extracelular* (como compuesto oxidante) de los leucocitos peritoneales, no se encuentran diferencias entre los dos grupos antes y después de administrar el LPS. El aumento en la generación de este radical libre tras la inyección de endotoxina fue apreciada tanto en los supervivientes como en los no supervivientes, incluso a las 2 horas los niveles en el grupo de supervivientes fueron mayores que en los que murieron. Esto parece indicar que la generación de oxidantes por las células inmunitarias, un hecho inherente al shock endotóxico (Victor *et al.*, 2005; Singer, 2014), no es un factor relevante a la hora de determinar la supervivencia o no del individuo. Puede que otros parámetros del estado redox sean más relevantes para condicionar esa supervivencia. También puede suceder que la mayor producción de oxidantes tras la administración de la endotoxina produzca una cascada de generación de defensas, como las antioxidantes, y en este aspecto se podría incluir el aumento en los niveles de GSH detectados, que permitieran controlar mejor la respuesta del organismo a la infección.

*Los resultados obtenidos en este segundo objetivo nos indican que sólo se observan diferencias entre los dos grupos experimentales (los que sobrevivieron y los que no lo hicieron, antes de la administración de la endotoxina, en algunos parámetros funcionales y de estado redox de las células inmunitarias peritoneales, como el aniión superóxido intracelular, la capacidad proliferativa en respuesta a LPS y la actividad catalasa. Muy posiblemente estas diferencias de partida de los leucocitos peritoneales, jueguen un papel importante durante la respuesta*

*inmunitaria al ser sometida a un estado de estrés oxidativo agudo como el shock endotóxico. De hecho, tras el shock endotóxico inducido por la administración de LPS, se produjeron también diferencias entre los dos grupos, en los niveles de  $O_2^-$  intracelular, la respuesta proliferativa basal y en respuesta a LPS, la actividad NK, los niveles de GSH y los de anión superóxido extracelular. Así, se podría indicar que el grupo de animales supervivientes, manifiesta una mejor regulación de su estado redox, lo que se refleja en algunas funciones inmunitarias. Esto podría estar indicando que el tener unas características más típicas de una menor edad biológica, permitiría al organismo unos mejores mecanismos de control frente a la infección, permitiendo la supervivencia del individuo ante una misma cantidad de infección que los que tiene una edad biológica mayor.*

**5.3. Estudiar el efecto de una estrategia de *Hormesis* basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones ICR-CD1 hembras, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro. Esto se analizará tanto en animales controles como sometidas a un shock endotóxico letal, por LPS de *E. coli*, en la vejez.**

Los efectos horméticos se han documentado en varios organismos y con distintos factores de estrés, llamadas "*hormetinas*", que son las que generan la respuesta fisiológica de adaptación y protección celular (Rattan y Demirovic, 2009). Actualmente, es un fenómeno de creciente interés científico, a pesar que la base de su naturaleza sigue siendo en gran parte desconocida (Vaisermen, 2010). Sin embargo, por los efectos horméticos que ya se han descrito en la Introducción

de la presente tesis, se puede proponer a la hormesis como una nueva estrategia para mejorar la función inmunitaria. De hecho, los datos existentes, en estudios que han utilizado hormesis, en diferentes modelos biológicos, género, edad, número de intervenciones, distribución/intervalo de las mismas, etc fortalece la idea de que es un fenómeno ampliamente generalizable, siendo independiente del modelo, efecto que se mida y agente físico que se utilice, teniendo lugar una plasticidad de respuesta generalizada tanto en vertebrados como en invertebrados (Calabrese y Blain, 2005, 2011). En vista de que existe algún estudio previo sobre posibles respuestas horméticas a toxinas, tales como el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (Calabrese y Blain, 2005), en este tercer objetivo, se analizó el efecto de la aplicación de una “*hormetina*”, como es la administración de dosis bajas (0,1 mg/kg) de ese LPS de forma repetitiva, lo cual permitiría un pre-acondicionamiento y estimulación de los mecanismos de protección celular (Rattan, 2008), en ratones hembras adscritos a dos diseños experimentales: el envejecimiento cronológico y el prematuro

**Efecto del tratamiento hormético en ratonas con envejecimiento cronológico**

Este efecto se ha analizado tanto a nivel del sistema nervioso (mediante la realización de pruebas de conducta) como del sistema inmunitario (mediante la valoración de parámetros clave de funcionalidad y estado oxidativo). Además, como las evaluaciones del efecto del tratamiento hormético, llevado a cabo durante su edad adulta-madura, se han realizado cuando los animales alcanzaron la vejez, se incluyó un grupo de ratonas adultas como control de referencia que permitiera saber si los efectos del tratamiento mejoraría los parámetros estudiados hasta el punto de asemejarlos a los que muestran animales de edades menores.

En base a la experiencia previa de grupos de investigación, incluido el nuestro, especializados en el análisis de parámetros conductuales en animales (Halldner *et al.*, 2001; Giménez-Llort *et al.* 2002; Baeza *et al.* 2010) hemos llevado a cabo diferentes pruebas comportamentales en las ratonas viejas para comprobar el efecto de la hormesis. Se llevaron a cabo diversas pruebas que evalúan la capacidad sensoriomotora, la capacidad exploratoria y la aparición de posibles conductas de ansiedad, y se discutirán seguidamente, de forma general, los aspectos más relevantes. Dado que no hubo variaciones en los pesos de los animales, este factor no podía interferir en los resultados.

En lo que se refiere a la **capacidad sensoriomotora**, valorada en los reflejos, el equilibrio, la coordinación motora, el vigor muscular y el tipo de prensilidad empleado por los animales se pudo comprobar que el **reflejo visual** y el **de extensión posterior** no se encontraban afectados, ni por la edad ni por la hormesis. En la prueba de la **regla de madera** el equilibrio postural y la coordinación motora de los animales, dos hechos que permite detectar dicha prueba (Giménez-Llort *et al.*, 2002), se vieron afectados. El **equilibrio** de los animales, medido como porcentaje de caídas, fue menor en los animales viejos que en los adultos y el tratamiento hormético lo mejoró. La **coordinación motora**, considerando en la misma dos criterios, el porcentaje de animales que recorren al menos 1 segmento (criterio 1), y el porcentaje de animales que completan la prueba (criterio 2), disminuyó en los animales viejos respecto a los adultos, pero se recuperó en los de tratamiento hormético, presentando valores significativamente mejores que las viejas. De este modo, el tratamiento mejoró la coordinación

motora igualándola a la que presentan los animales adultos. En la prueba de la *cuerda tirante*, que nos proporciona información acerca del vigor muscular, la coordinación motora y el tipo de prensilidad de los animales (Miquel y Blasco, 1978; Baeza *et al.*, 2010), los resultados mostraron como el tratamiento hormético mejoró significativamente esas características asemejándose los valores de las mismas a los encontrados en los animales adultos. En resultados previos de nuestro grupo de investigación con ratones ICR-CD1 que realizaron esta prueba a lo largo del proceso de envejecimiento, y en la que se analizaba el número de animales que completaban con éxito la prueba (sin caerse de la cuerda), se observó que dicho número disminuía progresivamente a medida que avanzaba la edad de los animales. Además se comprobó que animales prematuramente envejecidos ya manifestaban una peor capacidad de realización de esta prueba en la edad adulta (Guayerbas *et al.*, 2002). Como esta prueba se ha propuesto como una de las que pueden detectar la edad biológica de los ratones, puesto que los que la llevan a cabo peor se mueren antes (Guayerbas *et al.*, 2002), se puede sugerir que el tratamiento hormético rejuvenece la edad biológica de los animales.

En lo que respecta a las pruebas para analizar el ***comportamiento exploratorio y la conducta de ansiedad***, la prueba de ***neofobia*** no mostró ninguna diferencia entre los tres grupos de animales estudiados. No obstante, si se observaron diferencias en la capacidad exploratoria horizontal cuantificada por la deambulación total en el campo abierto, la cual resultó menor en los animales viejos que en los adultos, pero los de hormesis la presentaron significativamente mejorada. Si bien esta deambulación total no manifestó diferencias entre los grupos cuando se analiza en el tablero de agujeros, el resultado puede explicarse por el tiempo que los animales emplean en explorar los agujeros. El % de ratones

con hormesis que exploran los agujeros fue significativamente mayor que en los controles viejos, asemejándose al de los adultos. Siendo esta prueba una indicación también de capacidad exploratoria por lo novedoso, esto es una exploración dirigida (Driscoll *et al.*, 2009), el tratamiento de hormesis permite mantenerla con características propias de los animales más jóvenes. Por lo que respecta a la actividad exploratoria vertical (valorada por las conductas de “rearing”), tanto en el campo abierto como en el tablero de agujeros y en el laberinto en T, los animales con hormesis demostraron una significativa mejor actividad que los viejos controles, asemejándose de nuevo a los adultos. El comportamiento de “grooming” y la presencia de bolas fecales y de orina no presentó variaciones estadísticamente significativas entre los tres grupos. Por esto y la falta de diferencias en el tiempo de recorrido del laberinto en T, parámetros relacionados con el estado de ansiedad de los ratones (Guayerbas, 2003; Baeza, 2009; Baeza *et al.*, 2010), se puede indicar que en este aspecto los ratones viejos no manifiestan el típico aumento de ansiedad de la vejez, y que por tanto la hormesis no afecta les afecta.

En general, los valores obtenidos en los animales con hormesis fueron mejores que los de los viejos que no tuvieron ese tratamiento y similares a los de los adultos controles. Dado que esos parámetros conductuales se han utilizado para detectar un envejecimiento prematuro a nivel del sistema nervioso (Baeza *et al.*, 2010), y que determinadas intervenciones, como el ejercicio físico, pueden mejorarlos (Gimenez-Llort *et al.*, 2010, Revilla *et al.*, 2014), la hormesis se muestra como un tratamiento eficaz para “rejuvenecer” el sistema nervioso en el envejecimiento.



A pesar de no encontrarse estudios que relacionen pruebas conductuales con un tratamiento hormético específico con LPS, sí hay investigaciones sobre la efectividad de estrategias de carácter hormético para contrarrestar el daño oxidativo en enfermedades neurodegenerativas (Mathers *et al.*, 2004; DiSilvestro *et al.*, 2012). Además, hay evidencias de que la inducción de las respuestas horméticas provoca cambios en el estado redox celular a nivel del S.N, y que esta regulación, a través de vías de señalización celular que modulan los procesos de proliferación, supervivencia y reparación, pueden prevenir el deterioro del sistema nervioso (Mohammad *et al.*, 2005; Pérez-Cruz *et al.*, 2011; Luna-López *et al.*, 2013). De esta manera, se podría sugerir que el tratamiento hormético empleado en el presente estudio, probablemente active mecanismos y vías de señalización similares, lo cual se refleje en una mejora de las respuestas conductuales en la vejez. No obstante, en la actualidad, aunque la evidencia experimental indica que no existe un mecanismo único sino varias vías que son capaces de desencadenar la hormesis (Zhang *et al.*, 2008; Calabrese *et al.*, 2011), todavía no se conocen adecuadamente todos esos mecanismos y vías de transducción de señales por las cuales la respuesta hormética se lleva a cabo, siendo este un importante campo de futuras investigaciones.

#### *Estudio de los parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos peritoneales*

Los resultados obtenidos en lo que respecta a las funciones de las células inmunitarias estudiadas, tales como la movilidad espontánea, migración dirigida o quimiotaxis, fagocitosis, actividad microbicida (niveles intracelulares de  $O_2^{\cdot-}$ ) y la actividad NK, demostraron, de nuevo, la disminución que las mismas experimentan al envejecer y que resulta coincidente con los datos obtenidos en trabajos previos

(De la Fuente *et al.*, 2004; De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2014). No obstante, los animales que recibieron el tratamiento de hormesis mostraron un aumento significativo, en prácticamente todos los casos, de tales funciones en comparación con los valores obtenidos en los animales viejos controles. Esa estimulación generada por la hormesis igualó los valores de las funciones estudiadas a los que presentaban los animales adultos. Por lo tanto, la baja dosis de LPS ejerce un efecto hormético en lo que a las funciones inmunitarias analizadas se refiere. Esto permite proponer la estrategia de hormesis utilizada en la presente tesis como un excelente tratamiento para “rejuvenecer” el sistema inmunitario en la vejez. Dado que las funciones analizadas se han propuesto como marcadores de velocidad de envejecimiento y por tanto de edad biológica, relacionándose con la esperanza de vida del individuo (De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2014), la mejoría que produce el tratamiento de hormesis, apunta a su efectividad como estrategia para ser utilizada en este sentido.

Con respecto a los parámetros de estrés oxidativo analizados como la actividad de la enzima antioxidante CAT y los niveles del  $O_2^{\cdot-}$  extracelular, como compuesto oxidante, los resultados volvieron a mostrar una disminución y un aumento de estos parámetros, respectivamente, al envejecer. Esto ratifica resultados obtenidos en otros trabajos y la idea propuesta de que la inmunosenescencia tiene como base un estrés oxidativo que de forma crónica se establece en las células inmunitarias al avanzar la edad (De la Fuente *et al.*, 2004; De la Fuente y Miquel, 2009; Vida *et al.*, 2014; De la Fuente, 2014). Cuando los animales reciben un estrés leve por la administración de bajas dosis de LPS durante su vida adulta-madura, esto es, el tratamiento de hormesis, los valores de estos parámetros aumentan y disminuyen, respectivamente, con respecto a los de

los animales viejos control, siendo parecidos a los correspondientes valores obtenidos en el grupo de los ratones adultos. De hecho, en estudios realizados con modelos animales sugieren que la hormesis puede incidir en la señalización para aumentar una mejor respuesta ante el estrés oxidativo y mantener la homeostasis celular del organismo encarando posibles perturbaciones internas y externas (Haigis y Yanker, 2010; Ristow y Zarse, 2010). Este mejor estado redox que genera la hormesis realizada en el presente trabajo explicaría la mejor función inmunitaria que se ha comentado también tiene lugar.

*En resumen, todos estos resultados sobre la buena regulación que a nivel del sistema nervioso (mejorando la respuesta conductual) y del sistema inmunitario (con un mejor estado funcional y redox de los leucocitos peritoneales), ejerce el tratamiento hormético utilizado, sugieren que el mismo puede ser propuesto como excelente estrategia para mantener más jóvenes los sistemas reguladores en la vejez y por tanto conseguir una mejor salud y longevidad. De hecho, los efectos beneficiosos de esta hormesis son similares a los obtenidos con cantidades adecuadas de antioxidantes, con una actividad física adecuada y con el enriquecimiento ambiental (De la Fuente et al., 2005; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz et al., 2010; De la Fuente, 2014, 2015). Por todo ello, parece posible que la intervención hormética utilizada en este trabajo pudiese servir para tener una mejor respuesta en la vejez frente a un proceso infeccioso, hecho que se quiso comprobar con el siguiente experimento realizado en la presente tesis.*

En base a la comunicación neuroinmunoendocrina, ampliamente aceptada en la actualidad, en nuestro laboratorio se generó un modelo de envejecimiento

premature en ratón, que tiene como base fundamental la diferente capacidad exploratoria espontánea que manifiestan los animales, de un grupo de igual edad y sexo, en la prueba del laberinto en T. La manera en que los ratones realizan esta prueba comportamental, se encuentra relacionada con la capacidad funcional de su sistema inmunitario, de tal forma que los animales que tardan más tiempo en hacer el recorrido del brazo largo del laberinto, muestran una peor función inmunitaria, de hecho una inmunosenescencia prematura. También manifiestan un sistema nervioso con una neuroquímica más envejecida, una conducta de ansiedad y unos parámetros endocrinos propios de más edad cronológica. Dado que esos animales siempre mueren antes que los de su misma edad y sexo que hacen el recorrido de ese laberinto de forma más rápida, se les denominó PAM (de las siglas en inglés de “prematurely aging mice”), y a los que realizaban bien la prueba NPAM (de las siglas en inglés “non prematurely aging mice”). En toda una serie de publicaciones nuestro grupo han ido profundizando en las características de este modelo de envejecimiento prematuro (De la Fuente *et al.*, 1998; Guayerbas, 2003; Alvarado, 2006; Alvarez, 2006; Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente y Vida, 2013; Manassra, 2014; Vida *et al.*, 2014).

#### **Efecto del tratamiento hormético en ratonas con envejecimiento prematuro**

Para analizar este efecto se utilizaron **PAM y NPAM** a los que se les sometió al mismo tratamiento de hormesis que a los ratones comentados en el apartado anterior, durante su edad adulta-madura, esto es, 0,1 mg/kg de LPS durante dos meses en cuatro sesiones con intervalos de 15 días. Finalizado este tratamiento se llevó a cabo un estudio de algunas funciones y parámetros de estado redox en las células inmunitarias peritoneales de esos animales, comparándolos con los

correspondeintes PAM y NPAM controles que no recibieron dicho tratamiento. Posteriormente, una vez que todos estos animales llegaron a la vejez ( $84 \pm 2$  semanas de edad), fueron evaluados con la misma batería de pruebas conductuales realizadas en el primer apartado de este objetivo. Al finalizar el estudio conductual se procedió a la provocación de un shock endotóxico letal por administración de 50 mg/kg de LPS, tanto en los PAM y NPAM controles como en los que había tenido el tratamiento hormético, para así analizar los efecto de la hormesis sobre las funciones inmunitarias y estado redox de los leucocitos peritoneales al ser sometidos a un estrés de carácter agudo, como el que propicia un shock endotóxico letal.

*Estudio de la función y estado redox en las adultas-maduras prematuramente envejecidas tras la administración del tratamiento hormético*

Los resultados obtenidos han mostrado que el tratamiento de hormesis es capaz de mejorar significativamente las funciones de las células inmunitarias, tales como la fagocitosis (I.F) y la actividad NK, tanto en NPAM como en PAM adultas-maduras. Además, se apreció que los PAM con hormesis presentaron una cierta activación de su capacidad microbiciada (niveles de  $O_2^-$  intracelular), hecho que no se observó en los NPAM. Al igual que lo observado en los animales cronológicamente viejos, la hormesis parece ejercer un efecto positivo en las funciones inmunitarias estudiadas de estos animales adultos-maduros. Con respecto a la actividad de la enzima antioxidantes CAT, también los ratones adultos-maduros mostraron una mayor actividad, hecho que ocurrió en los NPAM, pero de forma muy acusada en los PAM. Dado que no hubo cambios en los niveles del  $O_2^-$  extracelular (compuesto oxidante) parece ser que en estos animales es en

la activación de las defensas antioxidantes donde repercute el efecto de la hormesis.

*Estudio conductual en la vejez de los animales prematuramente envejecidos que habían recibido el tratamiento de hormesis*

Al igual que en el apartado anterior, hemos llevado a cabo diferentes pruebas comportamentales que evalúan la capacidad sensoriomotora, la capacidad exploratoria y la aparición de posibles conductas de ansiedad. Las pruebas conductuales se realizaron en la vejez (a la edad de  $84 \pm 2$  semanas) por lo que es posible que algunas pruebas se vean afectadas por la edad avanzada de los animales. Antes de iniciar la batería de pruebas conductuales se pesó a los ratones, no encontrándose diferencias entre los grupos experimentales (NPAM control, NPAM hormesis, PAM control y PAM hormesis).

Los resultados correspondientes a la **capacidad sensoriomotora** (los reflejos, el equilibrio, la coordinación motora, el vigor muscular y el tipo de prensilidad), mostraron falta de diferencias en el *reflejo visual* y en el *reflejo de extensión posterior*, los cuales se encontraban intactos en todos los grupos experimentales. La prueba de la *regla de madera*, nos permite valorar la capacidad de equilibrio postural (medido como % de caídas) en la tampoco se apreciaron diferencias, y la coordinación motora (valorada como el porcentaje de animales que recorren uno o más segmentos y el porcentaje de animales que realizan la prueba), los PAM con hormesis presentaron los mejores porcentajes en relación a los segmentos recorridos de la prueba y los NPAM con hormesis los mejores porcentajes en la realización de la prueba. Estos resultados podrían indicar que la hormesis favorece un mantenimiento del correcto equilibrio postural de los

ratones, y puesto que se ha relacionado esos parámetros conductuales con el estado de los sistemas musculo-esquelético y sensorial (Paxinos, 2015), el tratamiento con hormesis parece mejorarlos en la vejez. En la prueba de la *cuerda tirante*, que nos proporciona información acerca del *vigor muscular*, la *coordinación motora* y el tipo de *prensilidad* de los animales, la hormesis moduló positivamente el vigor muscular de los PAM al presentar un % menor de caídas, hecho que no se apreció en los NPAM. También la hormesis mejoró la prensibilidad, tanto en PAM como en NPAM, y la coordinación motora, todas ellas capacidades que se deterioran al avanzar la edad. De hecho, en resultados previos, se ha comprobado que los PAM ya manifestaban una peor capacidad de realización de este test a las edades tempranas con respecto a aquellos NPAM de la misma edad cronológica (Guayerbas *et al.*, 2002, 2005). La hormesis parece ejercer un mayor efecto en los animales que están más envejecidos (PAM). Es importante destacar que los animales no presentaron “freezing”, es decir, se quedan inmóviles o petrificados en el momento en el que se vieron sometidos a la pruebas conductuales. El comportamiento de “freezing” se define como la ausencia completa de movimientos del cuerpo, siendo una respuesta normal de los animales ante un inevitable estímulo de miedo o temor, y ansiedad (Brandao *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2009).

Con respecto al segundo bloque de pruebas conductuales que valoran la ***capacidad exploratoria y conductas de ansiedad***, de nuevo en la prueba de *neofobia* no se vieron diferencias entre los grupos. En el *campo abierto* y en el *tablero de agujeros* en los que se valoran las actividades exploratorias horizontal y vertical, el comportamiento de “grooming” y la presencia de bolas fecales y orina, sólo se vieron diferencias estadísticamente significativas en algunos de los aspectos

analizados. Así, la hormesis aumentó el % de PAM que realizó “rearing” de centro. Esto supone una mejor capacidad de exploración vertical, de equilibrio y muscular (como la detectada por la prueba de la cuerda tirante) y de menor ansiedad (el centro supone un lugar del que los animales intentan escapar, especialmente si presentan un rasgo de ansiedad, como ha sido comprobado en los PAM (Viveros *et al.*, 2001,2007). Aunque en el tablero de agujeros la hormesis parece disminuir la deambulación (indicadora de actividad exploratoria horizontal) en los PAM, realmente se debe a un mayor interés en la exploración dirigida, que aunque no obtuvo diferencias estadísticamente significativas, sí aumentó en estos animales, como también lo hizo el “grooming”, este de forma significativa. Un mayor acicalamiento o “grooming” se ha considerado tanto como indicativo de una mayor ansiedad como de lo contrario (Gimenez-Llort *et al.*, 2002). En este caso, parece que la hormesis generó un mayor estado de relajación en los PAM, lo que se percibe por ese aumento del acicalamiento. Los NPAM con hormesis sí mostraron un aumento significativo de su actividad exploratoria dirigida en comparación con los correspondientes controles. En la prueba del **laberinto en T** que además de servir para la clasificación previa de los animales en PAM y NPAM puede ayudar a valorar las capacidades exploratorias vertical y horizontal de los animales en un entorno totalmente diferente al campo abierto y al tablero de agujeros (en cuanto a forma y dimensiones), los datos obtenidos mostraron que hubo un aumento en el número de “rearing” en los ratones con hormesis. Este aumento en la exploración vertical puede explicar el que no se encuentren efectos en la exploración horizontal, máxime en un aparato que ya les puede resultar familiar a los animales.

En general, la conducta de los NPAM y especialmente de los PAM viejos resultó favorecida por el tratamiento hormético, al igual que se comentó



anteriormente para los ratones cronológicamente viejos, pero sin clasificar en PAM y NPAM. La hormesis mejora las capacidades sensoriomotoras, de exploración y disminuye la ansiedad, en la vejez. Parece por tanto, proteger algunos mecanismos deteriorados al envejecer del sistema nervioso. De hecho, Calabrese (2008), indicó que la red nerviosa sería de las “primeras en responder” a desafíos de estrés y orquestaría respuestas de adaptación coordinadas que podrían implicar cambios de comportamiento. Hay estudios que apoyan esta modulación del sistema nervioso por toxinas de algas, ácido kaínico y ácido domoico, que al unirse a receptores de glutamato los activan, y en cantidades bajas a moderadas median en procesos como el aprendizaje y la memoria y comportamientos sensorio-motor (Hampson y Manalo, 1998; Mattson, 1988; Lessmann, 1998). Lo mismo se ha visto para la atropina (producido por la planta de solanáceas *Atropa belladonna*), que se une e inhibe los receptores muscarínicos de acetilcolina (Lawrence y Kirk, 2007). Por todo lo indicado y en vista de los resultados obtenidos en lo referente al comportamiento, se puede sugerir que el tratamiento de hormesis utilizado en la presente tesis (cantidades bajas y repetidas de LPS), parece resultar efectivo para mejorar la respuesta conductual en la vejez.

*Estudio de los parámetros de función y estrés oxidativo en leucocitos peritoneales en la vejez de los animales prematuramente envejecidos con tratamiento de hormesis tras la administración de un shock endotóxico letal*

Una vez observado que el tratamiento de hormesis ejerce una modulación positiva en la respuesta inmunitaria y estado redox de las células peritoneales en ratones cronológicamente viejos, se podría esperar que este tipo de intervención mejorara la capacidad funcional y estado redox de las células inmunitarias frente a

un shock endotoxico, lo que se estudió utilizando animales clasificados en PAM y NPAM.

Los parámetros funcionales de las células inmunitarias peritoneales que se han estudiado han sido: la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, la capacidad fagocítica de macrófagos, la capacidad digestiva (niveles de  $O_2^-$  intracelular), la linfoproliferación (basal y en respuesta a los mitógenos Con A y LPS) y la actividad antitumoral NK. Respecto a los parámetros de estrés oxidativo, se ha valorado la actividad de CAT y los niveles de GSH (como defensas antioxidantes), y los niveles de anión superóxido extracelular y la actividad XO (como oxidantes).

En la **quimiotaxis de los macrófagos**, se apreció que en los controles PAM este índice es menor que en los controles NPAM, lo cual es coincidente con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo comparando esta función en PAM y NPAM (Guayerbas *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2003; Guayerbas *et al.*, 2004, Alvarado *et al.*, 2006a; Alvarado *et al.*, 2006b). En los animales controles (que no han recibido el tratamiento de hormesis) la administración de 50 mg/kg de LPS no produjo ningún cambio en esta función, pero en los que recibieron la hormesis, la administración de la endotoxina generó un aumento muy significativo tanto en los PAM como en los NPAM. Esto hace que los animales que recibieron hormesis tengan una respuesta a esa dosis de LPS similar a la que mostraron los animales cronológicamente adultos y longevos (como se comentó en la discusión del objetivo 1). En la **capacidad fagocítica de los macrófagos**, la disminución en los PAM controles no fue significativa respecto a los NPAM, y al administrar la endotoxina sólo se encontró estimulación en el I.F. de los PAM con hormesis. De esta forma, de nuevo la hormesis permitió una respuesta a la endotoxina en esta

función más parecida a la que tuvieron los animales cronológicamente adultos (objetivo 1). Además, antes de la administración de la endotoxina, los PAM con hormesis mostraron unos valores de I.F mayores que los PAM controles. Por tanto el tratamiento hormético resultó muy positivo para la capacidad de fagocitosis en los PAM, los cuales la tienen deteriorada (Guayerbas *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2003; Guayerbas *et al.*, 2004, Alvarado *et al.*, 2006a; Alvarado *et al.*, 2006b). Estos resultados observados sugieren que la hormesis a dosis bajas de LPS, proporciona un pre-acondicionamiento que mejora la respuesta de funciones como la quimiotaxis y la fagocitosis ante el shock endotoxico, y especialmente, en los ratones PAM. De hecho, este mismo fenómeno de pre-acondicionamiento fue observado en bacterias sometidas a una pequeña exposición previa de un “mutágeno” causando en ellas una respuesta adaptativa ante una exposición más aumentada del “mutágeno” (Samson y Cairns, 1977).

En lo que respecta, a los resultados de los **niveles de anión superóxido intracelular**, capacidad que expresa la digestión de los macrófagos, se observó, por una parte, unos niveles menores en los controles PAM respecto a los NPAM, lo cual es coincidente con resultados previos de nuestro grupo de investigación (Guayerbas *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2003). Por otra parte, los animales que recibieron hormesis, tanto PAM como NPAM, mostraron antes de que les fuera administrada la endotoxina unos valores mayores de anión superóxido intracelular. Se repite de nuevo en estos animales lo observado en los cronológicamente viejos, la hormesis estimula esta capacidad asemejándola a la que presentan los animales adultos, y haciendo un efecto similar al que producen otras estrategias como la administración de antioxidantes, el ejercicio o el enriquecimiento ambiental (Ortega *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2010; Arranz *et al.*,

2011; De la Fuente *et al.*, 2011). En respuesta a la administración de endotoxina se da un aumento significativo de esta función, fundamentalmente en los animales con hormesis y especialmente en los PAM. Ante estos resultados, parece indicarnos que la capacidad digestiva leucocitaria de estos animales con hormesis permanece preservada en respuesta del shock endotóxico, mostrando respuestas parecidas a las que llevan a cabo los animales cronológicamente más jóvenes. Hay estudios en otros modelos horméticos que implican el aumento de este radical, como es el caso de hormesis por antioxidantes (NAC y Vit C) y por exposición a la hiperoxia (Yanase y Ishii, 2008; Yang y Hekini, 2010). También se ha comprobado que ratones y humanos con tolerancia a la endotoxemia muestra un aumento de esta radical (Kawano *et al.*, 2007; Check *et al.*, 2010; K Saha *et al.*, 2012).

En lo referente a las funciones de los linfocitos, la **quimiotaxis**, muestra unos cambios parecidos a los comentados suceden en los macrófagos. También los PAM controles muestran menor quimiotaxis que los NPAM, lo que es coincidente con los resultados previos (Guayerbas *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2003; Guayerbas *et al.*, 2004). Los ratones que recibieron el tratamiento de hormesis mostraron una mejor capacidad de quimiotaxis antes de la administración de la endotoxina, lo que sucedió tanto en PAM como en NPAM. Esta estimulación parece favorecer la respuesta que hacen los animales a la endotoxina en esta función, pues sólo los animales con hormesis mostraron una estimulación a las 2 y 24 horas de la inyección del LPS, hecho que no se apreció en los correspondientes controles. Estos resultados señalan que el efecto de las bajas dosis de LPS, podrían modular la respuesta quimiotáctica de estos animales. Dado que se ha comprobado que en animales sépticos tratados con CC receptor de quimioquinas 4 (CCR4), se aumenta el TNF- $\alpha$  (Nara y Yamashita, 2010), y puesto que, como se señalado en anteriores

apartados, esta citoquina se encuentra involucrada en la activación de la quimiotaxis en los cuadros de shock séptico, posiblemente un escenario parecido puede que se esté dando al llevar a cabo el tratamiento de hormesis.

En lo concerniente a la **capacidad proliferativa de los linfocitos**, en la lifoproliferación basal se da un aumento significativo tanto en el estado previo a la inyección del LPS (0 horas), como después de su administración (2 y 24 horas) en los animales PAM con hormesis, lo que se asemeja a la respuesta que presentan los animales adultos del primer objetivo. También, en un estudio en ratones adultos con shock endotóxico la proliferación basal o espontánea aumentó (Victor y De la Fuente, 2003d). En lo referente a los resultados obtenidos en respuesta a Con A y LPS, mitógenos de células T y B, respectivamente, se apreció como la hormesis mejora esta función, tanto en NPAM, pero especialmente en PAM (pues sucede con los dos mitógenos), antes de la administración de la endotoxina. Tras la inyección de la misma, la hormesis hace que la estimulación proliferativa sea muy significativa en los dos grupos. En estudios de tratamientos horméticos en ratones, utilizando bajas dosis de radiación (LDR *del inglés: low-dose radiation*), se ha comprobado que se facilita la llamada sinapsis inmunitaria entre las CDs y linfocitos T, provocando un aumento de la proliferación, hecho que no sucedió con altas dosis de radiación (HDR *del inglés high-dose radiation*) (Liu *et al.*, 1998, 1999, 2000). De hecho, en ratones BALB/c y C57BL/6 expuestos a dosis de LDR (0,04 Gy/día durante 5 semanas), sus células esplénicas estimuladas con Con A aumentaron su respuesta de proliferación (Lui *et al.*, 2003). Estudios de hormesis indican que los aumentos proliferativos se deben, en cierta medida, al aumento de los receptores de superficie como CD46, CD80, CD86 y secreción por parte de los macrófagos y células dendríticas de citoquinas como IL-12p70 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ,

hecho que ocurre cuando se utiliza la LDR (Jin *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2001, 2001a). En estudios en ratas también se ha observado una restauración de la respuesta proliferativa a Con A y LPS por la administración de NMMA (*del inglés NG-monometil-L-arginina*) (Masson *et al.*, 1998), que puede ser considerada una hormetina. También en ratas Fisher y en ratones C57BL/6J, el 2-metoxietanol (ME) y su principal metabolito, el ácido 2-metoxiacético (MAA), han podido estimular la proliferación en ciertas condiciones (Smialowicz *et al.*, 1992). Un hecho similar se ha comprobado con el peróxido de hidrógeno, el cual en cantidades nanomolares actúa como un segundo mensajero activando la proliferación celular (Surdon, 1995; Pickering *et al.*, 2012). Es evidente que hay diferencias en las respuesta proliferativas dependiendo del modelo establecido, la especie y cepa utilizada, la sensibilidad a las hormetinas utilizadas, entre otros muchos factores, pero es este un campo que, como se ha propuesto, se debe potenciar en investigaciones futuras (Clanton *et al.*, 2015; Monaghan y Hausmann, 2015).

Por otra parte, la **actividad de las células NK**, mecanismo protector frente a tumores y células infectadas por virus (McArthur, 2000), se ve únicamente aumentado tras la administración de la endotoxina en los PAM con hormesis a las 24 horas, lo que hace esta respuesta más semejante a la de los animales adultos (objetivo 1). También los PAM con hormesis presentan mejor actividad NK antes de la administración de la endotoxemia, aunque las diferencias no alcanzan significación estadística. Estos resultados sugieren que la administración de LPS a baja dosis, tiene el potencial para inducir un efecto sobre la respuesta citotóxica, especialmente en los animales que tiene peor esta función, los PAM. Estudios con otros modelos de hormetinas como la irradiación, también potencian la actividad de las células NK y NKT (Pandey *et al.*, 2005; Cheda *et al.*, 2005; Nowosielska *et al.*,

2006; Ren *et al.*, 2006). Las células NK se activan por citoquinas producidas por los macrófagos como INF $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$  (Loza *et al.*, 2002; Biburger *et al.*, 2005), las cuales parecen ser responsables de la activación de esta función después de dosis baja de irradiación (Ren *et al.*, 2006). Posiblemente en los PAM se estén dando mecanismos similares al recibir las estimulaciones de bajas de LPS. De hecho, estudios *in vitro* de tolerancia a la endotoxina (LPS) en macrófagos murinos y monocitos humanos, han mostrado que la re-estimulación de citoquina inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , CCL3, CCL4 y CXCL10 podría estar involucrada en la actividad NK (Medvedev *et al.*, 2000; Dobrovolskaia *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2005; Cavaillon *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007; Del Fresno *et al.*, 2009; El Gazzar *et al.*, 2009; Mages *et al.*, 2007; Draisma *et al.*, 2009).

Al analizar la **actividad CAT** y los **niveles de GSH**, los resultados mostraron que los PAM controles tienen peores defensas antioxidantes que los NPAM, lo que resulta coincidente con resultados previos de nuestro grupo (XXXXX; Manassra, 2014). Cuando se considera el efecto del tratamiento de hormesis, antes de la administración de la endotoxina, el GSH aumentó significativamente en ambos grupos (PAM y NPAM), pero la actividad CAT sólo en los PAM. Al administrar la endotoxina, se apreciaron aumentos en todos los grupos para la CAT y el GSH, aunque los valores de estos parámetros antioxidantes fueron mayores en los animales que recibieron hormesis y especialmente en los PAM en el caso de la CAT. Diversos estudios horméticos con el uso de otros agentes como el cadmio, radiaciones UV, cloruro de 1-alquil-3 metilimidazolio ([Cnmim] Cl), manganeso, agregados amiloides del polipéptido de los islotes humanos (hIAPP) y peróxido de hidrogeno a dosis bajas producen en aumento de los antioxidantes como la CAT y la SOD en distintos modelos invertebrados y vertebrados (Mesquita *et al.*, 2010; Jia

*et al.*, 2013; Borch *et al.*, 2013; Rivera- Pastrana *et al.*, 2014; Dolci *et al.*, 2014; Zhang y Liu, 2015). Estas observaciones, sumadas a las de la presente tesis, parecen indicar que las células, en general, son sensibles a los efectos estresantes de las hormetinas y responden aumentando las defensas antioxidantes, lo que explicaría el efecto beneficioso de los tratamientos horméticos. De hecho, son varios los investigadores que consideran que las hormetinas promueve una resistencia al estrés oxidativo, lo que han observado en distintas especies y con diferentes condiciones (Pardon, 2007; Vermeulen y Loescheck, 2007, Mansoro 2009). Así, en roedores con hormesis por rayos UV se ha comprobado una tolerancia a las ROS (Murakami, 2006). En el aumento de los niveles de GSH generados por la hormesis podría estar implicado el aumento de la actividad del proteasoma, que a su vez aumenta la expresión de las proteínas de choque térmico (HSP *del inglés Heat shock protein*), las cuales propician el aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes (Beedholm *et al.*, 2004), siendo consideradas las propias HSP, concretamente la HSP 70, defensas con carácter antioxidante capaces de regular la “oxi-inflamm-aging” (Martinez de Toda y De la Fuente, 2015). De hecho, en fibroblastos humanos la aplicación de HS (*del inglés Heat stress*), mostró un aumento de esta actividad antioxidante, mantenimiento elevados los niveles de MAP kinasas, JNK1 y JNK2 (Fonanger *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2006; Hashmi *et al.*, 2014). También se ha documentado, la influencia del ejercicio como otra condición hormética que propicia en aumento de algunos compuestos antioxidantes, además del de las HSP (Arumugan *et al.*, 2006; Rattan *et al.*, 2008; Radak *et al.*, 2008; Landi *et al.*, 2010; Calabrese *et al.*, 2011). Asimismo, las propiedades horméticas de la dieta, tanto en la restricción calórica como la suplementación con antioxidantes, promueven el aumento de enzimas



antioxidantes (Kouda *et al.*, 2010; Siow y Mann, 2010). Otra posible hormetina, la melatonina, aumenta los niveles de GSH y disminuye el daño cerebral en ratas sépticas (Sener *et al.*, 2005). Según diversos estudios, una posible vía implicada en el aumento de estos antioxidantes es la activación Keap1/Nrf2/ARE que inducen la expresión de sus proteínas como la glutatión sulfidril transferasa (GST), hemoxigenasa, quinona-oxidoreductasa (NQO1) y la  $\gamma$ -glutamyl cisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) (Erlank *et al.*, 2011).

En lo que respecta a los **niveles de anión superóxido extracelular** los resultados muestran que son mayores en los PAM que en los NPAM controles. Los estudios previos, realizados en nuestro grupo de investigación, señalaron un aumento en los niveles de este radical libre al envejecer y en los PAM en mayor medida que en los NPAM (Guayerbas *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2003; Guayerbas *et al.*, 2004, Alvarado *et al.*, 2006a; Alvarado *et al.*, 2006b). En los animales con hormesis tiene lugar una disminución de los niveles de ese radical libre en los PAM, antes de la administración de la endotoxina. Otras estrategias horméticas, como la restricción calórica y el ejercicio, parecen también modular la tasa de producción de este radical (Aruguman *et al.*, 2006). Después de administrar la endotoxina se produce un aumento en los dos grupos de ratones de este radical, algo que sucedió también en los ratones adultos. Asimismo, la actividad de la **xantina oxidasa (XO)** fue mayor en los PAM que en los NPAM controles, lo que es coincidente con otros resultados obtenidos en este modelo, en otros de envejecimiento prematuro como la obesidad (Hunsche *et al.*, 2015) y con el envejecimiento cronológico (Vida *et al.*, 2011). En los animales con hormesis, tanto NPAM como especialmente PAM, la XO fue menor que en los que no recibieron ese tratamiento, antes de la administración de la endotoxina. En estudios en los que se

utilizaron otros posibles mediadores horméticos como el carbacol (CAR) o la electro-acupuntura (EA), se obtuvo también una disminución de la actividad xantina oxidasa (Hu *et al.*, 2009; 2009a; Shi *et al.*, 2010). Tras la administración del LPS, si bien en los NPAM se observó un aumento de la XO, tanto en controles como en los de tratamiento de hormesis, esto no sucedió en los PAM. Si se considera que la actividad elevada xantina oxidasa es un posible marcador de la gravedad de la sepsis en pacientes (Luchtemberg *et al.*, 2008), se podría indicar cómo la hormesis puede, al disminuirla aumentar la supervivencia de los animales, hecho que ha sido obtenido en el presente trabajo.

A vista de los resultados obtenidos, hemos podido demostrar que las bajas dosis repetidas de LPS, generan cambios del estado redox de los leucocitos peritoneales que intentan contrarrestar el efecto del estrés oxidativo agudo que genera un shock endotóxico, especialmente en los ratones PAM, proporcionando una mejor respuesta de estos animales ante la infección. Es importante indicar, como limitaciones del presente estudio, que sólo se ha valorado, en el caso del glutatión, el reducido (GSH) y no la forma oxidada (GSSG). El valorar el GSSG y poder tener el cociente GSSG/GSH, una medida sensible y fiable del nivel de estrés oxidativo global presente en las células (Sies, 1999; Schafer and Buettner, 2001; Jones, 2002), sería interesante en el contexto en el que estamos. Asimismo, la protección de las células frente al daño oxidativo depende también de la actividad de otras enzimas antioxidantes importantes, además de la CAT, como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, entre otras, que tampoco se han analizado en este trabajo, debido a la limitación de la cantidad de muestra que se ha podido obtener. Todos ellos serían parámetros relevantes a ser analizados en el futuro.

---

*En resumen el tratamiento hormético en ratones viejos con envejecimiento prematuro (PAM) mejora algunos parámetros de conducta de los animales, así como de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Tras la administración de 50 mg/kg de LPS, la respuesta funcional y estado redox de los leucocitos peritoneales resultan más apropiadas en los ratones que recibieron la hormesis, hecho que se manifiesta de una mayor supervivencia de los animales.*

**5.4. Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratonas ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico.**

Una vez analizado el efecto del shock endotóxico sobre los distintos parámetros de función y estado oxidativo de los leucocitos peritoneales procedentes de ratones ICR-CD1 hembras de distintas edades, en este cuarto objetivo nos propusimos a analizar el efecto que sobre esos parámetros produce tener la suplementación de una dieta enriquecida con 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) y 0,1% de tioprolina (TP) en ratones de esas diferentes edades con shock endotóxico. Entre las estrategias nutricionales que más se han empleado para intentar contrarrestar la inmunosenescencia y el estrés oxidativo en el envejecimiento, se encuentran los compuestos antioxidantes como la vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -carotenos, selenio, zinc, polifenoles e incluso compuestos tiólicos (Guayerbas *et al.*, 2002; Marcos *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2006, De la Fuente *et al.*, 2008, 2011). Dado a la amplia experiencia de nuestro grupo en la utilización de antioxidantes tiólicos como la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP) a nivel de mejorar el sistema inmunitario, funcionalmente y su estado redox, en situación de estrés oxidativo crónico como el

envejecimiento (Guayerbas *et al.*, 2004; Alvarado *et al.*, 2005, 2005a; De la Fuente, 2010) y con shock endotóxico (Victor *et al.*, 1998; Victor *et al.*, 2001, 2001a), se optó por administrar a los ratones esta dieta de antioxidantes. Tienen una conocida acción sobre los radicales libres (Rahman *et al.*, 2006; Braunersreuther y Jaquet, 2012) y sobre el sistema nervioso (Bavarsad *et al.*, 2014; Steckert *et al.*, 2014). Se ha seleccionado la dosis de un 0,1% de cada uno de los antioxidantes y un tiempo de administración de cuatro semanas en base también a la experiencia previa de nuestro grupo (De la Fuente *et al.*, 1998; De la Fuente *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2003, De la Fuente, 2015). En los leucocitos peritoneales procedentes de ratones hembras ICR-CD1 de diferentes edades [30±2 (adultas), 80±2 (viejas) y 126±2 (longevas) semanas] y usando como controles animales de la mismas edades que ingirieron una dieta control, se valoraron los parámetros ya previamente indicada de función y estado redox a tiempo 0 (previo a la administración de la endotoxina) y a las 2 y 24 horas tras la inyección de 50 mg/kg de LPS. Se utilizó este diseño ya que en trabajos previos se ha observado que el efecto de los antioxidantes es mayor cuando se administra de forma previa, más que cuando se incorporan de forma simultánea o posterior al shock séptico (Konupoglu *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004).

Cuando se analizó el efecto de la dieta en el **peso corporal** de los animales, en los distintos grupos experimental analizados. Se comprobó que si bien, la dieta control indujo un aumento progresivo del peso corporal en todas las edades analizadas, con un aumento significativo a la cuarta semana de ingesta, la dieta suplementada con NAC y TP provocó una pérdida progresiva de peso en todos los grupos de edad. Estos resultados, en el peso corporal, se ajustan con los obtenidos de la **cantidad de ingesta** dado que se mantuvo un consumo normal en el caso de la

dieta control, pero una disminución en el caso de la dieta suplementada. El peso corporal y la ingesta son factores que pueden afectar la velocidad de envejecimiento de las funciones fisiológicas y su capacidad de respuesta homeostática del individuo. De hecho, el mantenimiento de un peso ideal se relaciona con muchas características fisiológicas positivas para el sujeto, y por tanto, con su bienestar y salud (García-Barreno, 2005). Los cambios que tienen lugar con la edad en el peso corporal e ingesta difieren dependiendo al lote de ratones empleados y a la edad cronológica que se inicie el tratamiento con antioxidantes tiólicos (Álvarez, 2006). La pérdida de peso que acontece en los grupos de edad con dieta suplementada, puede ser debida al efecto de los antioxidantes lo que esta coincide con los resultados previos en roedores (Popovich *et al.*, 2003).

A analizar los efectos de la dieta suplementada con los antioxidantes tiólicos en las funciones de los macrófagos, se observaron con referente a la **quimiotaxis**, no hay diferencias en el estado previo (0 horas) a la administración de la endotoxina y tras la inyección de LPS, se aprecia un aumento a las dos horas en las animales adultas y longevas al comparar con lo que sucede en el grupo que recibió la dieta control. Un hecho parecido sucedió en las longevas con el índice fagocítico y en las adultas con eficacia fagocítica. En la **capacidad fagocítica** la ingestión de antioxidantes, sí modificó la respuesta tras la endotoxina en adultas, viejas y longevas (para la E.F) generando una respuesta mayor de esta función. Con relación la **capacidad digestiva celular (niveles de  $O_2^-$  intracelular)** en presencia de estímulo, a las 0 horas se aprecia una disminución en las adultas, pero una activación en las longevas. También las respuestas a las 2 y 24 horas de administrar el LPS fueron mayores en longevas que ingirieron antioxidantes, especialmente en adultas y viejas. Estos resultados obtenidos en el presente trabajo son coincidentes en lo que respecta

a la capacidad fagocítica y digestiva con los previos en ratones adultos que ingirieron con una dieta similar de esta en antioxidantes (Blanco *et al.*, 1999). No obstante, la quimiotaxis se estimuló en esos animales, mientras que no cambió en el presente trabajo. Es posible que esa diferencia en los resultados dependa en cierto grado del tiempo de ingesta de los antioxidantes (5 semanas) y la edad de los animales de 28 semanas de edad, mientras que el presente tratamiento fue de 4 semanas y en animales de 30 semanas de edad. Parece que en general, el efecto de la ingestión de los antioxidantes se aprecia más claramente en la respuesta de los macrófagos al shock endotóxico, dando una mayor estimulación en las funciones analizadas. Estos resultados no son coincidentes con los obtenidos en los en ratones adultos a la que se administra NAC i.p 30 minutos después del LPS (Victor *et al.*, 2003), lo que demuestra que los efectos de ingestión de antioxidantes en las dieta son muy diferentes de la administración directa de las mismas, en el contexto de shock endotóxico.

Los resultados obtenidos en las funciones analizadas de los linfocitos, como la **quimiotaxis** y la **linfoproliferación** tanto basal como en respuesta a mitógenos Con A y LPS, en el estado previo a la endotoxina (tiempo 0) muestran que la ingestión de antioxidantes no modifica la quimiotaxis, pero si aumenta la proliferación en los animales adultos y no en viejas con esa cantidad de los antioxidantes es coincidente con resultados previos, en la que se observó que ratonas viejas necesitaban ingerir unas cantidades mayores de NAC+TP para estimular la proliferación (De la Fuente *et al.*, 2002). En respuesta a la endotoxina los animales adultos y longevos muestran una mayor estimulación de la quimiotaxis de linfocitos que las que tomaron la dieta control, al menos 2 horas, hecho que no se apreció en los viejos. Un hecho semejante se apreció en la proliferación. Parece que la ingestión de los antioxidantes modula la respuesta funcional de los linfocitos en el shock de forma similar en adultas y

longevas, y no se ve ese efecto en viejas. De nuevo se podría deberse la falta de efecto diferencial en los animales viejos en la que la dosis de los antioxidantes no es suficiente, en una edad en la que la situación de estado oxidativo es mucho mayor (De la Fuente *et al.*, 2002; Vida *et al.*, 2014).

En lo que respecta a la **respuesta NK** de los leucocitos peritoneales de ratones, la ingesta de antioxidantes no evidenció cambios significativos en esta función en ninguna de las edades estudiadas antes de la administración de la endotoxina. No obstante, si generan una mayor actividad NK a las 2 y 24 horas de inyectar el LPS en adultos y longevos. De nuevo, la regulación de una función tan relevante como la NK en el proceso del shock endotóxico es igual en los ratones de otras edades, resultando diferentes en los viejos, posiblemente por ser baja la cantidad de los mismos que ingieren para el estado funcional y redox de sus células inmunitarias (De la Fuente *et al.*, 2002; Vida *et al.*, 2014).

Dentro de las defensas antioxidantes analizadas como la **actividad de CAT** y los **niveles de GSH**, los resultados obtenidos muestran que en el estado previo a la inyección del LPS (0 horas), tiene lugar un aumento de las mismas en animales adultos, viejos y longevos que tomaron la dieta suplementada en relación a los que ingirieron dieta control. El aumento más acusado tuvo lugar en los animales viejos. Como se ha venido mencionando a lo largo del presente trabajo, los individuos de mayor edad muchas veces no tienen la capacidad de generar compuestos antioxidantes para contrarrestar los aumentos en compuesto oxidantes, que producen mostrando un claro estado de estrés oxidativo crónico que es apreciado en las células inmunitarias (De la Fuente *et al.*, 2011; Vida *et al.*, 2014). Parece evidente que la ingestión de la dieta suplementada si es claramente efectiva para activar las

defensas antioxidantes endógenas, lo que resulta coincidente con trabajos previos (Alvarado, 2006; Álvarez, 2006; Vida *et al.*, 2014). Además, los valores de compuestos oxidantes estudiados en el presente trabajo, como el anión superóxido extracelular y la xantina oxidasa, aparecen disminuidas en los animales que toman la dieta con NAC+TP, lo cual también ha sido observado en el caso del O<sub>2</sub><sup>-</sup> extracelular (De la Fuente *et al.*, 2002). Esta disminución del anión superóxido extracelular, que aparece sólo animales viejos, parece mostrar como a esta edad, la ingestión de las cantidades apropiadas de antioxidantes de la dieta puede lograr un adecuado estado redox en las células inmunitaria, lo cual les va permitir a las mismas, aunque no se refleje en una función, sí un mejor control de la situación de estrés oxidativo del organismo, lo que puede repercutir en la supervivencia. Los resultados encontrados en animales viejos que toman la dieta suplementada con antioxidantes en un parámetro como en los niveles de anión superóxido, que no deja de ser un radical libre de oxígeno, pueden dar luz sobre la relevancia de entender en qué contexto se está analizando una ROS. Así, el anión superóxido intracelular aumenta significativamente frente a los que toman dieta control, mientras que sucede lo contrario en el anión superóxido extracelular. El primero representa una mejor capacidad digestiva de las células y en este caso los antioxidantes lo aumentan. Resultados semejantes fueron obtenidos previamente con esta dieta (De la Fuente *et al.*, 2002), y en estudios *in vitro* demuestran una acción directa de los antioxidantes en esta función (De la Fuente y Hernanz, 2012). El segundo, el extracelular supone un peligro para el organismo, y en este caso los antioxidantes lo disminuyen. Considerando los resultados previos del estado basal de los leucocitos peritoneales, es evidente la importancia de la condición de las células, para conseguir las cantidades de ROS y antioxidantes necesarias en el momento enfrentarse a los procesos infecciosos. En este contexto, se observó que los



animales que tomaron la dieta con los antioxidantes tiólicos en respuesta al shock endotóxico tuvieron una mayor activación de CAT en las tres edades estudiadas también presentaron mayores niveles de GSH. En lo que respecta a los oxidantes estudiados disminuyen, en general. Todo ello ratifica la idea antes indicada de que el tomar una dieta con antioxidantes va a preparar mejor a las células inmunitarias frente a un proceso infeccioso. Esto se refleja en la supervivencia. Así, en estudios sobre los efectos antioxidantes de NAC, evaluaron que el daño oxidativo y parámetros inflamatorios después de CLP, donde esta terapia mejoró la capacidad de antioxidante total, disminución de la peroxidación lipídica en inflamación en la sepsis (Tokliu *et al.*, 2008). Dado que el estrés oxidativo es central para la fisiopatología de la sepsis, las intervenciones con antioxidantes podrían tener un impacto en mejorar el pronóstico de estos pacientes. Sus efectos, dependen de toda una serie de factores como el momento en el que se administran y la cantidad (Brealey *et al.*, 2002; Mishra, 2007). Entre otros, Victor y colaboradores demostraron que la NAC disminuyó los niveles de ROS, TNF, MDA, el cociente GSSG / GSH y iNOS, y el aumento de las defensas antioxidantes en macrófagos peritoneales y linfocitos en animales con shock endotóxico. Por otra parte, el tratamiento de la NAC impidió la activación de NF- $\kappa$ B, la mejora de la estado redox de estas células inmunes (Victor *et al.*, 2003).

Un hecho a destacar, es que el efecto de los antioxidantes depende en cierto grado, de la edad de los individuos. Por ejemplo en los animales viejos, en la que las funciones inmunitarias se encuentran deterioradas con respecto a las células de los individuos de menor edad, como consecuencia del estrés oxidativo crónico propio de estos animales (De la Fuente y Miquel, 2009), la dieta rica en antioxidantes (NAC+TP) utilizada en el presente trabajo, muestra menor efecto en los parámetros de función que los de estado oxidativo de los leucocitos peritoneales. También, a cada edad, las

cantidades de los antioxidantes incorporados en la dieta necesarios para una buena regulación inmunitaria son diferentes. En una edad una cantidad puede ser insuficiente y en otras puede resultar pro-oxidante (De la Fuente *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2003; Elbling *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2012).

Otro factores a tener en cuenta para comprender las diferencias entre los resultados obtenidos en distintos diseños experimentales, son el inicio de la suplementación, la edad y estado del individuo que empieza a tomar la dieta (Bezlepkin *et al.*, 1996, Guayerbas *et al.*, 2002), la duración del período de suplementación (Wood *et al.*, 1999), las interacciones de los antioxidantes suplementados con otros compuestos del organismo (Spapen, 2004; Mukai *et al.*, 2005), la dosis aplicada (Lowe *et al.*, 1999), la manera como son administrados (Shibamura *et al.*, 2009), el estado nutricional (Solomos, 1999) y la fisiopatología individualizada ante la sepsis (László *et al.*, 2015).

*En resumen de todo lo mencionado, los resultados parecen apuntar en general, a que los antioxidantes administrados en la dieta (NAC+TP), y en las cantidades utilizadas (0,1%) en todos los grupos de edad analizados, pueden ayudar a disponer de mejores funciones inmunitarias y estado redox de los leucocitos peritoneales de los ratones, especialmente ante el desafío de un shock endotóxico. Esto se puede ver reflejado en un aumento de la supervivencia de los animales.*

**5.5. Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Así mismo, estudiar la supervivencia de estos ratones, en ambos sexos, con diferentes cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales.**

El presente trabajo supone la primera aproximación a aplicar el modelo de shock endotóxico ya analizado en cepas de ratones como la ICR-CD1 o la BALB/c (Victor *et al.*, 2001; Victor *et al.*, 2001a; Victor y De la Fuente, 2001), en ratones de la cepa C57BL6/129. En los estudios previos con otras cepas de ratones en la edad adulta, ya se ha observado como la administración de LPS en dosis 100, 150 y 250 mg/kg LPS produce un fuerte impacto a nivel funcional y estado oxidativo de leucocitos peritoneales, específicamente en macrófagos y linfocitos (Victor *et al.*, 1998; Victor *et al.*, 2000; Victor *et al.*, 2001, Victor *et al.*, 2001a) y como hubo diferencia por el sexo de los animales. En los objetivos previos de la presente tesis, se ha comprobado como eso sucede también en ICR-CD1 de diferentes edades. En este último objetivo, el planteamiento fue, profundizar el efecto de la endotoxina en una cepa distinta en la edad vieja y en ambos sexos. En base a esto último, es importante indicar aquí algunos aspectos del dimorfismo sexual en el sistema inmunitario. Al igual que otras células del organismo (Chikanza y Grossman, 2000). Como ya se mencionó en la introducción, las interacciones neuroinmunoendocrinas son muy complejas (Besedovsky y Del Rey, 1996; Giron-González *et al.*, 2000), y en este contexto, la base de las diferencias sexuales se encuentra principalmente en la función y desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) (Grossman *et al.*, 1991; Morales-Montor *et al.*, 2004), ya en trabajos

previos se ha comprobado la diferente capacidad inmunitaria y de estado redox entre machos y hembras, presentando estas últimas, en general, una respuesta celular mas activada y un menor estado de estrés oxidativo (De la Fuente *et al.*, 2002; Baeza *et al.*, 2007; Baeza *et al.*, 2009). Esto se relaciona con el dimorfismo sexual asociado a cuadros infecciosos (Grossman *et al.*, 1989; Zuk y Mckean, 1996; Olsen *et al.*, 2001; Morales-Montor *et al.*, 2004). Además, las diferencias entre los sexos, y retomando la implicación de la IL-2, en estudios realizados en roedores se ha demostrado que los estrógenos inducen un incremento en la producción de citoquinas tipo Th2 como la IL-5, y la disminución de citoquinas Th1 como la IL-2 (Ahmed *et al.*, 1996). Asimismo, la progesterona tiene efectos anti-inflamatorios inhibiendo el desarrollo de células Th1 mientras que promueve el patrón Th2 (Piccini *et al.*, 2000). Esta diversidad funcional en el sistema inmunitario con la dicotomía Th1/Th2, se incluye para explicar una gama de procesos patológico que incluyen las infecciones (Mosmann, 1996; D'Ambrosio *et al.*, 2000; Jankovic *et al.*, 2001; Kidd, 2003; Romagnani *et al.*, 2004). Además, se ha extendido a las distintas poblaciones del sistema inmunitario como macrófagos (Mantovani *et al.*, 2002), células dendríticas, NK (Cooper *et al.*, 2001), linfocitos T citotóxicos (Sad *et al.*, 1995), linfocitos B (Amel *et al.*, 2003) y células T reguladoras (Campbell *et al.*, 2007).

En línea como los objetivos anteriores, se han analizado los mismos parámetros tanto de función (quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, fagocitosis de macrófagos, capacidad digestiva celular (niveles  $O_2^-$  intracelular), actividad proliferativa y actividad natural killer) como de estado oxidativo (actividad CAT, niveles de GSH, niveles de anión superóxido extracelular y actividad XO) de los leucocitos peritoneales procedentes de estos animales.

Con relación a los resultados obtenidos en la quimiotaxis, se apreció a nivel del estado inicial (0 horas) previo a la administración de la endotoxina, niveles similares en ambos sexos, una vez administrada la dosis de LPS, se observó un aumento de la quimiotaxis a las 2 y 24 horas en hembras, mientras que en los animales machos tuvo lugar una disminución a las 24 horas. Comparando la respuesta a una dosis similar de LPS en hambras viejas de la cepa ICR-CD1 (ya estudiada en el primer objetivo) se aprecia que la cepa C57BL6/129 muestra una activación superior en la quimiotaxis. Aunque no hay trabajos previos con lo que comparar, si se consideran las diferencias obtenidas en la edad adulta entre los ratones BALB/6 y Swiss, y también se aprecian respuestas diferentes como en el caso de la quimiotaxis (Victor *et al.*, 2001a). En cuanto a la diferencia por sexos durante el shock endotóxico, estos resultados son claramente indicativos que las hembras presentan mejores índices que quimiotaxis que los machos ante la endotoxemia. Por otro lado, la modulación de la respuesta inmunitaria es dependiente del sexo. En este sentido, un estudio con ambos sexos y diferentes cepas, reflejan que el efecto del LPS fue mayor en machos BALB/c que en hembras, mientras que en Swiss ocurrió lo contrario, por ejemplo en la función de quimiotaxis (Victor *et al.*, 2001a). Dado el papel de citoquinas como el TNF- $\alpha$  en la respuesta inmunitaria al shock y especialmente modulada por MIF (Calandra y Bucala, 1997; Bosmann y Ward, 2012; Novotny *et al.*, 2012; Hirsiger *et al.*, 2012; Lasklo *et al.*, 2015), esta citoquina podría participar en la diferente respuesta entre machos y hembras. De hecho, en líneas celulares de macrófagos de ratón, la testosterona induce la síntesis de IL-10 que tiene efectos anti-inflamatorios mediante la inhibición de TNF- $\alpha$ , mientras que el estradiol incrementa la

producción de TNF- $\alpha$  y disminuye la IL-10 en cultivos estimulados con lipopolisacárido (LPS) (D'Angostino *et al.*, 1999).

En lo que respecta a la **capacidad fagocítica**, la misma fue diferente, en el estado previo a la administración de LPS (0 horas), entre machos y hembras siendo más elevada en estas últimas, hecho que se apreció en el I.F pero no en la E.F, la cual fue similar en ambos sexos. El mayor I.F en hembras ha sido observado en otra cepa de ratones (Guayerbas y De la Fuente, 2003). Una vez administrado la dosis de LPS, la respuesta de los macrófagos fue un aumento de su I.F tanto a las 2 como a las 24 horas en ambos sexos. En cuanto a la E.F ambos sexos no muestra modificaciones en las primeras horas (2 horas) de instauración de la endotoxina, sin embargo a las 24 horas se pareció un aumento en las hembras. El comportamiento observado en la capacidad fagocítica de los leucocitos peritoneales en esta cepa, es similar al encontrado en los animales viejos ICR-CD1 (1<sup>er</sup> objetivo), como se indicó en el primer objetivo esto podría deberse a los altos niveles de citoquinas como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  en los cuadros de shock (Novotny *et al.*, 2012; Lázsló *et al.*, 2015). La respuesta mayor de las hembras al LPS en esta función, podría deberse a los menores niveles de IL-1 $\beta$  y mayores de PGE que tienen los machos que las hembras lo que proporciona mayor susceptibilidad a los machos frente a la sepsis bacteriana (Marriot *et al.*, 2006).

En relación a los niveles de **anión superóxido intracelular**, se ha observado que en el estado previo de la endotoxina (0 horas), hay diferencias relevantes niveles entre ambos mostrando niveles mayores las hembras, tanto en estado basal como estimulado. De nuevo, las hembras muestran un mejor estado funcional de sus células inmunitarias. Tras la inyección de la endotoxina, ambos

sexos muestran disminuciones de este radical tanto a las 2 como a las 24 horas, pero los machos presentan los niveles más bajos de esta radical. Los resultados obtenidos son semejantes a los valorados en ratones hembras viejos ICR-CD1 de la primera parte del presente estudio (1er objetivo), por lo que se pueden indicar los mismos posibles mecanismos, ya descritos en el primer objetivo.

Cuando se consideran las funciones estudiadas en los linfocitos, los resultados de **la quimiotaxis**, mostraron que en el estado basal previo a la administración de la endotoxina (0 horas), las hembras tienen una mayor quimiotaxis que la de los machos. Esta mayor quimiotaxis de las hembras se ha observado en linfocitos especie en machos y procedentes de otras localizaciones (De la Fuente et al., 2004), una posible causa podría ser el efecto del estradiol en la expresión de receptores de quimioquinas en células T (Mo *et al.*, 2005). Tras la administración de la dosis de LPS, ambos sexos manifiestan un aumento a las 2 horas. Ese aumento se mantiene en las hembras a las 24 horas, pero no en machos. A todos los tiempos analizados, los animales machos reflejaron una quimiotaxis menor que las hembras. El aumento en las hembras tras la inyección del LPS a las 2 y 24 horas es coincidente con el obtenido en los animales viejos ICR-CD1 (1er objetivo) y se podría indicar, para esta cepa C57BL6/129), unas causas semejantes a las mencionadas en la disminución de ese parámetro en el primer objetivo.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la **respuesta linfoproliferativa** tanto en estado basal como en respuesta a la Concanavalina A (mitógeno para linfocitos T) y lipopolisacarido (mitógeno para linfocitos B), en el estado previo a la administración del LPS, muestran unos valores similares en ambos sexos. Así, en esta cepa de ratones no se dan en la vejez diferencias en la linfoproliferación fue

machos y hembras, hecho que también ha sido observado en ratas (De la Fuente *et al.*, 2004; Baeza *et al.*, 2009). No obstante, una vez aplicada la inyección de la endotoxina, los machos no manifiesta modificaciones en el estado proliferativo basal, mientras que las hembras presentan un pico a las 2 horas. En respuesta a los mitógenos como la Con A y LPS, se apreció una disminución de la respuesta proliferativa a las 2 y 24 horas en ambos sexos, sin observarse diferencias entre ellos. Estos resultados, no coinciden con los observados en las hembras ICR-CD1 viejas con shock endotóxico del primer apartado de la presente tesis en las que se aprecia un aumento a las 2 horas. La disminución observada en la cepa C57BL6/129 puede ser debida al aumento de la apoptosis de la células B y T, que puede suceder en la sepsis (Sirgo *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2012).

Otra de las funciones valoradas en la presente tesis fue la actividad antitumoral **natural killer** de los leucocitos peritoneales, lo resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativa entre los machos y las hembras, en el estado previo de la aplicación del LPS, a pesar de apreciarse valores más elevados en las hembras. Aunque, en la edad adulta parece evidente la mayor actividad NK en las hembras, no así en la vejez. Incluso se han visto datos en ratas que indican una mayor capacidad NK en machos (De la Fuente *et al.*, 2004; Baeza *et al.*, 2009). En cuanto se realizó la administración de la endotoxina, el patrón de ambos sexos fue diferente, las hembras mostrando una disminución a las 2 horas y no variando significativamente esta actividad en los machos. Resulta curioso la diferente respuesta de las hembras al LPS en las dos cepas de ratones, ya que en las ICR/CD1 viejas, se observo justo lo contrario un aumento a las 2 horas tras la administración del LPS (1<sup>er</sup> objetivo).



Al analizar en este apartado de la tesis las defensas antioxidantes como la CAT y GSH, los resultados obtenidos antes de la administración de la endotoxina, muestran valores similares en machos y hembras. Una vez administrado el LPS, se observaron respuestas diferentes en los dos sexos. Los animales machos no manifiestan variación en la actividad CAT y mantienen valores mayores que las hembras, estas últimas a su vez, presenta una disminución de CAT con una caída significativa a las 24 horas. Por otra parte, los niveles de GSH en el grupo de animales machos muestran una disminución a las 24 horas, mientras que las hembras aumentan tras la administración del LPS con un pico significativo a las 24 horas. El comportamiento observado en las hembras viejas de esta cepa, con respecto a los antioxidantes analizados, en respuesta a la endotoxemia, no coincide con el de la cepa ICR-CD1, en las cuales la CAT aumenta a las 2 horas y el GSH no varía. El aumento tras el LPS en el GSH, podría deberse a la estimulación del Nrf2, el cual se ha comprobado que mejora la respuesta antioxidantes en roedores con sepsis (Kong *et al.*, 2011; MacGarvey *et al.*, 2012).

En lo que respecta a los niveles del  $O_2^{\cdot -}$  extracelular, en el momento previo a la administración de la endotoxina. Las hembras muestran valores mayores que los machos tanto en estado basal como estimulado. Sin embargo, en el otro parámetro de oxidación evaluado, la XO, se encontró por el contrario disminuida en las hembras. Es un hecho aceptado que las hembras se encuentran menos oxidadas que los machos debido al papel antioxidante de los estrógenos (Borras *et al.*, 2006; Viña *et al.*, 2013, Kovats, 2015) De hecho, hay estudios que indican que las hembras se encuentran menos oxidadas que los machos (De la Fuente *et al.*, 2004; Viveros *et al.*, 2007). Dado que el estado oxidado es la base de la velocidad del envejecimiento, este se ha utilizado para explicar en que las hembras de

mamíferos muestren una esperanza de vida media mayor que los machos (Borras *et al.*, 2006; De la Fuente y Miquel, 2009). En el presente estudio ese mayor estado de oxidación de los machos se ha apreciado en la XO. **La actividad de la XO**, se ha manifestado como un parámetro fundamental en la velocidad del envejecimiento y de la capacidad funcional de las células inmunitarias, del estado redox general del organismo y en la longevidad media de los individuos (Vida *et al.*, 2011, 2011a; Vida *et al.*, 2014). Tras recibir la endotoxina tanto en machos como en hembras aumentaron los niveles de anión superóxido extracelular en condición de estimulación a las 2 y 24 horas. Este comportamiento en hembras viejas fue similar en la cepa ICR-CD1 (primer objetivo de la presente tesis). Esta cepa, no sigue, sin embargo, el mismo comportamiento que la ICR-CD1 en los niveles intracelulares de anión superóxido, parece pues evidente que los mecanismos implicados en la generación de este radical libre, intracelular y extracelular, en respuesta al LPS siguen mecanismos diferentes en las hembras viejas de las de cepas de ratones estudiados.

Además, al administrar el LPS, estos ratones C57BL6/129 no muestran cambios de la actividad XO en los machos, mientras que las hembras manifiestan un incremento a las 2 y 24 horas. Similares resultados fueron observados en pacientes tanto con shock séptico y sepsis grave, donde las variaciones en la actividad XO se propusieron útiles para la predicción de la supervivencia ante un cuadro séptico (Luchtemberg *et al.*, 2008). Otros estudios también señalan que la XO es indicativo de la mayor actividad oxidativa en la fase tardía de la sepsis (Devrim *et al.*, 2008).

*En base a los resultados obtenidos, los leucocitos peritoneales de esta cepa C57BL6/129, manifiestan una respuesta aumentada en hembras en respuesta al shock, para algunas de las funciones valoradas como la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos y la fagocitosis, así como en los niveles de GSH, pero también en los niveles de anión superóxido extracelular y en la actividad XO, hechos que no fueron tan claros en machos en los que sólo aumentó la fagocitosis, la quimiotaxis de linfocitos y el anión superóxido extracelular. Esto en conjunto, nos refleja la diferencia de la respuesta inmunitaria de uno u otro sexo al mismo tipo de estímulo antigénico. Estas diferencias asociadas al sexo sugieren el papel importante de las hormonas sexuales como moduladores del sistema inmunitario y de su capacidad de respuesta a la infección. De hecho, encontramos diferencias entre la supervivencia de los machos y las hembras tras la administración de la endotoxina, siendo estas últimas las que tienen una mayor supervivencia. Además, en el seguimiento de mortalidad de machos y hembras a diferentes edades y dosis de LPS, se apreció que los % de mortalidad más elevados fueron observados en los animales machos adultos, maduros, viejos y muy viejos con un espacio de tiempo de < 26 a 72 horas, y en el caso de las hembras en jóvenes en un espacio de tiempo de <26 a 96 horas. Se podría, apuntar que las hembras tienen un mejor control de su estado de estrés oxidativo crónico debido al envejecimiento y por ello, responden mejor al estrés oxidativo agudo de la endotoxemia. Aunque esto, como se ha comentado podría estar relacionado con los niveles de estrógenos circulantes (Borras et al., 2005; Borras et al., 2007), lo mismo no serían superiores a la de los machos en la vejez (Wilson, 1997; Kovast, 2015). No obstante, al igual que sucede en muchas características bioquímicas y fisiológicas, los individuos que en la edad adulta tienen mejores*

*capacidades, aunque luego las pierdan al envejecer, siempre mantienen una ventaja que se puede llegar a apreciar en la vejez.*

*Los datos obtenidos en la cepa C57BL6/129 apuntan a que estos animales manifiestan un envejecimiento cronológico de los parámetros analizados muy parecido a los de cepas estudiadas. Sin embargo, sería necesario un estudio valorando los parámetros de función y estrés oxidativo en animales de esa cepa a distintas edades para poder asegurar que manifiestan cambios con la edad simplemente. Dada a las diferencias encontradas en machos y hembras, sería también conveniente que en todos los estudios, y concretamente en lo que aborda la presente tesis, se utilicen los dos sexos.*

## ***Conclusiones***

---

## 6. Conclusiones

De los resultados expuestos en la presenta tesis pueden extraerse las siguientes conclusiones:

En relación al primer objetivo *“Estudio de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 adultas, maduras, viejas y longevas, así como su supervivencia, en respuesta a un shock endotóxico por administración de Lipopolisacárido (LPS) de E. coli ”*, puede concluirse que:

1.- En ratones hembras ICR/CD1 al avanzar la edad se aprecia un deterioro funcional y de estado redox en las células inmunitarias peritoneales, hecho que no sucede en los animales longevos, los cuales, en general, mantienen valores similares a los adultos. Este estado basal va a condicionar los cambios funcionales y de estrés oxidativo tras la administración intraperitoneal de 50 mg/Kg de endotoxina (LPS). En general, en adultas y longevas se da una estimulación de muchas de las funciones y de defensas antioxidantes estudiadas, lo que no es igualmente apreciable en las otras edades. Esas respuestas funcionales y redox son diferentes en adultas y viejas tras la administración de un shock endotóxico letal por inyección de 100 g/kg y 25 mg/kg de LPS, respectivamente. La administración de 50 mg/kg de LPS, que produce un shock endotóxico letal en todas las edades, con excepción de los ratones adultos, es seguida de una supervivencia menor en viejas y maduras y mayor en las longevas.

En relación al segundo objetivo *“Comparación de los cambios en parámetros funcionales y de estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 de edad madura, que sobrevivieron o murieron tras la administración de 50 mg/kg de LPS”*, se puede concluir que:

2.- Las hembras ICR-CD1 maduras que sobreviven tras recibir 50 mg/kg de LPS, el 20% del total, presentan una mejor capacidad de digestión de los leucocitos, mayor respuesta linfoproliferativa y especialmente más actividad catalasa, antes de serles administrada la endotoxina. Tras recibir el LPS, las supervivientes muestran unas funciones y estado redox de sus células inmunitarias, al menos en las primeras horas del shock, en mejores condiciones que los animales que no supervivientes.

En relación al tercer objetivo *“Estudio del efecto de una estrategia de Hormesis basada en la administración de pequeñas cantidades de LPS, en la edad adulta, a ratones hembras ICR-CD1, sobre parámetros conductuales de los animales, así como parámetros de función y estrés oxidativo de las células inmunitarias peritoneales de ratones cronológicamente viejos y con envejecimiento prematuro, y tanto en animales sometidos a un shock endotóxico letal, por LPS de E. coli, en la vejez, como en los correspondientes controles”*, se puede concluir que:

3.- El tratamiento hormético llevado a cabo mediante la administración de 0,1 mg/Kg de LPS, como hormetina, en ratonas maduras, produce una mejor respuesta conductual en la vejez de estos animales tanto en la capacidad sensoriomotora como en la exploratoria, asemejándose a la que muestran los adultos. Esta estrategia hormética mejora funciones inmunitarias y parámetros de estado redox en los leucocitos peritoneales en la vejez, alcanzándose valores semejantes a los de adultos. Además, ese mismo tratamiento hormético llevado a cabo en ratones con

envejecimiento prematuro (PAM) también mejora, en la vejez, los parámetros de conducta y la funcionalidad y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Tras la administración de 50 mg/kg de LPS, la respuesta funcional y redox de esas células resulta más adecuada en los que recibieron hormesis, lo que se acompaña de una mayor supervivencia de los animales.

En relación al cuarto objetivo *“Estudio del efecto de la ingestión de una dieta enriquecida con una mezcla de antioxidantes tiólicos: 0,1% de N-acetilcisteína (NAC) + 0,1% de tioprolina (TP), en la funcionalidad y estado redox de células inmunitarias peritoneales de ratones hembras ICR-CD1 adultas, viejas y longevas con shock endotóxico por administración de LPS de E.coli”*, puede concluirse que:

4.- La ingestión de una dieta suplementada con un 0,1 % p/p de N-acetil cisteína (NAC) y tioprolina (TP) durante cuatro semanas, en animales adultos, viejos y longevos, mejora las funciones y estado redox de los leucocitos peritoneales, especialmente en la vejez. La administración de un shock endotóxico con 50 mg/kg de LPS, produce una mejor respuesta funcional y redox en las células de los animales que ingirieron la dieta con antioxidantes en comparación con los controles, en general, en todas las edades, y en algunos parámetros fundamentalmente en las adultas y longevas. Todo ello repercute en una mayor supervivencia de estos animales.

En relación al quinto objetivo *“Profundización en el modelo de shock endotóxico letal en ratones hembras y machos viejos de la cepa C57BL6/129 en lo referente a los cambios de función y estado redox de las células inmunitarias peritoneales. Estudio de la supervivencia de ratones C57BL6/129, en ambos sexos, con diferentes*



*cantidades del LPS administradas y a diferentes edades de los animales”, se concluye que:*

5.- Los ratones viejos de la cepa C57BL6/129 hembras, muestran una mejor condición basal en las funciones y estado redox de sus leucocitos peritoneales, en comparación con los machos. También presentan una mejor respuesta funcional y de estado redox tras la administración de 50 mg/kg de LPS, lo que se acompaña de una mayor supervivencia. Estas respuestas, en las hembras viejas de esta cepa, son, en algunos aspectos, diferentes a las mostradas por las hembras de la cepa ICR/CD1 de la misma edad. La supervivencia de las hembras de la cepa C57BL6/129, a diferentes edades y frente a diferentes cantidades de LPS, es mayor que la de los machos.

*Como conclusión general se puede indicar que la edad cronológica y biológica del individuo es fundamental a la hora de condicionar la respuesta inmunitaria frente a un mismo proceso infeccioso y consecuentemente determinar su supervivencia. Los tratamientos horméticos y con dietas enriquecidas en antioxidantes, como la NAC y la TP, permiten mejorar el estado inmunitario y redox de los individuos y su respuesta frente a un shock endotóxico, lo que se acompaña de una mayor supervivencia. La cepa de ratones y, especialmente el sexo, condicionan la respuesta inmunitaria y la supervivencia a la infección.*

## ***Referencias bibliográficas***

---

## **7. Referencias bibliográficas**

Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Imunología Celular y Molecular*. 4<sup>ta</sup> Edición. The McGraw-Hill, 2003.

Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1877-1883.

Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 2009;101:36-47.

Aebi, H. Catalase in vitro, *Methods Enzymol* 1984;105: 121-126 .

Agrawal A1, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol* 2007 Jun 1;178(11):6912-22.

Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. *Immunol Rev*. 2009;227:5-8.

Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* 1998;141(5):1147-57.

Allman D, Miller JP, B cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:463-67.

Alonso-Fernández P, De la Fuente M. Role of the immune system and longevity. *Curr Aging Sci* 2011; 4(2):78-100.

Alonso-Fernández P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 2244-51.

Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 2008; 30 Suppl 1:3-9.

Alves-Filho JC, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Benjamim CF, Basile-Filho A, Arraes SM, Cunha FQ. Neutrophil function in severe sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; 6(2):151-8

Ameri P, Ferone D. Diffuse endocrine system, neuroendocrine tumors and immunity: What's new? *Neuroendocrinology* 2012;95:267-276.

Ames B.M, Shigenaga M.K, Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90:7915-7922.

Amstrong R. S., Sohal R. G., Cutler R. G. and Slater T. F. (eds). *Free Radicals Molecular Biology, Aging and Disease.* Raven, New York 1984.

Andersson, U. and Tracey, K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu. Rev. Immunol* 2012; 30, 313–335.

Andrades, M. et al. Bench-to-bedside review: sepsis – from the redox point of view. *Crit. Care* 2011; 15, 230.

Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care.* 2002;6:298-305.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7):1303-10.

Angus DC. The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster?. *JAMA* 2010; 304(16):1833-4.

Aninat C, Seguin P, Descheemaeker PN, Morel F, Malledant Y & Guillouzo A. Catecholamines induce an inflammatory response in human hepatocytes. *Crit Care Med* 2008;36, 848–854.

Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA.* 2009;301:2362-2375.

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 365:63–78.

Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock.* 2005;24:300-312.

Ariga SK, Abatepaulo FB, Melo ES, Velasco IT, Pinheiro da Silva F, de Lima TM, Soriano FG. Endotoxin tolerance drives neutrophil to infectious site. *Shock* 2014 Aug;42(2):168-73.

Arnalich F, García-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J. Predictive value of nuclear kappa $\beta$  activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun* 2000; 68(4):1942-1945.

Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor-kappa  $\beta$ . *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65: 941-50.

Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor kappa B. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010;65(9):941-50.

Arranz L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. Differential expression of Toll-like receptor 2 and 4 on peritoneal leukocyte populations from long-lived and non-selected old female mice. *Biogerontology* 2010; 11(4):475-82.

Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, De la Fuente M. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res* 2010a; 13: 415-28.

Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1252-62.

Arranz L, Lord JM, De la Fuente M. Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age (Dordr)*. 2010;32(4):451-66.  
Arranz L, Naudí A, De la Fuente M, Pamplona R. Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *Age* 2013;35(3):621-35.

Arteaga M, Chavarría A, Morales Montor J. Immunoneuroendocrine communication network and homeostasis regulation: the use of hormones and neurohormones as immunotherapy. *Rev Invest Clin* 2002; 54(6):542-9.

Arulkumaran Shanmugam, Shilpi Rajoria, Andrea L. George, Abraham Mittelman, Robert Suriano\*, Raj K. Tiwari. Synthetic Toll Like Receptor-4 (TLR-4) Agonist Peptides as a Novel Class of Adjuvants. *PLoS ONE*; 2012; Vol 7 (2).

Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., Gutteridge, J. M. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex, *Biochem.J* 1989; 258: 617-620 .

Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Free radicals in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;120(2):168-78.

Ayala A, Knotts JB, Ertel W, Perrin MM, Morrison MH, Chaudry IH. Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. *ArchSurg*. 1993;128:89-94; discussion 94-85.

B. Shankar, R. Pandey, K. Sainis, Radiation-induced bystander effects and adaptive response in murine lymphocytes *Int J Radiat Biol* 2006 82 537-548

Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 1978; 298:659-68.

Baeuerle PA and Baichwal VR. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997; 65: 111-137.

Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Fdez-Tresguerre J, De la Fuente M. Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-aging in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males. *Biogerontology* 2011; 12: 227-38.

Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Fdez-Tresguerras J, De la Fuente M. Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-ageing in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males. *Biogerontology*. 2011;12(3):227-38.

Baeza I, De Castro NM, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* 2010; 219: 90-9.

Barr WG. Uric Acid. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 165.

Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol. Res* 2001; 180: 5-15.

Basoglu A, Sen I, Sevinc M, et al. Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha in neonatal calves with presumed septicemia. *J Vet Intern Med* 2004;18:238-241.

Beckman JS y Koppenol WH. "Nitric oxide, superoxide, and peroxyinitrite: the good, the bad and ugly." *Am. J. Physiol* 1996; 271:C1424- C1437.

Beckman JS, YeYZ Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR. "Extensive nitration of protein tyrosines in hyman atherosclerosis detected by immunohistochemistry." *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*. 1994; 375:81-88.

Beedholm R, Clark B.F.C, Rattan S.I.S. Mild heat stress stimulates proteasome and its 11S activator in human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Cell Stress Chaperon* 2004; 9:49-57.

Bell, K.F. et al. Activation of Nrf2-regulated glutathione pathway genes by ischemic preconditioning. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2011; 689524.

Bellisai F, Morozzi G, Scaccia F. Evaluation of the effect of bosentan treatment on proinflammatory cytokine serum levels in patients affected by systemic sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24:261-264.

- Belyakovich AG. Tetrazolium method for studying the catalytic properties of oxidoreductases in cellular organelles immobilized on glass surfaces. *Anal Biochem* 1983;131(2):404-9.
- Benito, E., Portoles, M. T., Bosch, M. A. Involvement of calcium in the stimulation of phosphatidylcholine secretion in primary cultures of rat type II pneumocytes by *Escherichia coli* lipopolysaccharide, *Mol.Cell Biochem* 2000; 205: 39-44 .
- Berczi I, Quintanar-Stephano A, Kovacs K. Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1153:220–239.
- Berger FM. The effect of endotoxin on resistance to infection and disease. *Adv Pharmacol.* 1967;5:19-46.
- Berger, M.M. and Chioloro, R.L. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* 2007; 35, S584–S590
- Berlett BS1, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313-6.
- Bernik, T. R. et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Exp. Med* 2002; 195, 781–788.
- Berry, L. J. Bacterial toxins, *CRC Crit Rev.Toxicol* 1977; 5: 239-318 .
- Berry, L. J. Pathogenesis of atoxinogenic strains of gram--negative bacteria—a hypothesis, *Klin.Wochenschr* 1982; 60: 693-695 .
- Besedovsky H y De Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions:facts and hypotheses. *Endocrin Rev* 1996; 17:64-102.
- Besedovsky H, Sorkin E. Network of the immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 1977; 27:1-12.
- Besedovsky H.O, Del Rey, A, Sorkin, E. "Integration of Activated Immune Cell Products in Immune Endocrine Feedback Circuits." p. 200 in *Leukocytes and Host Defense Vol. 5* [Oppenheim, J.J.; Jacobs, D.M., eds]. Alan R. Liss, New York 1984,.
- Besedovsky HO, del Rey A. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res* 2011; 36(1):1-6.
- Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17(1):64-102.
- Besedovsky HO, Del Rey A. Regulating inflammation by glucocorticoids. *Nat Immunol* 2006 ; 7(6):537.

- Besedovsky HO. Influence of administration of glucocorticoids on the development of lymphoid organs in pregnant rats. *Sangre (Barc)* 1971;16(4):371-6
- Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003;3:169-176.
- Bielsky BH y Gebieki, JM. Application of radiation chemistry to biology. Free radicals in biology. P. W.A., Academic Press 1977; 3:1-19.
- Bishop RE. Fundamentals of endotoxin structure and function. *Contrib Microbiol.* 2005;12:1-27.
- Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, et al. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4- induced endotoxin tolerance. *J Immunol.* 2007;179:4083-4092.
- Biswas SK, Chittechath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res* 2012; 53(1-3):11-24.
- Bitzer Quintero OK, Dávalos-Marín AJ, Ortiz GG, Torres- Mendoza BM, Robles RG, Huerta VC, Beas-Zárate C. Antioxidant activity of tryptophan in rats under experimental endotoxic shock. *Biomer Pharmacother.* 2010; 64(1):77-81.
- Blackwell TS, Blackwell TR, Christman JW. Induction of endotoxin tolerance depletes nuclear factor- $\kappa$ B and suppresses its activation in rat alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1997;62:885-891.
- Blake D. R., Rallen R. E. and Lunec J. Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull* 1987; 45: 371-385.
- Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med* 2005; 257:126-38.
- Blasius, A.L., and Beutler, B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010; 32, 305-315
- Blomberg BB, Frasca D. Age effects on mouse and human B cells. *Immunol Res* 2013; 57(1-3):354-60.
- Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for further treatment. *BMJ* 2006; 326: 262-266.
- Bochud, P. Calandra, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment: *British Medical Journal*. 2003; Vol:326:262-266 p.p.
- Böhrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jilmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NF- $\kappa$ B in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997; 100(5):972-985.
- Boivin, A., Mesrobian, I., Mesrobian, L. Technic of the preparation of the specific polysaccharides of bacteria, *C.R.Soc.Biol* 1933; 113: 490-492 .



Bollier M.G, Martin M. Thiazolidine 4 carboxylic acid, a fundamental molecule in the supply of sulphhydryl groups for liver detoxification and improvement of phatogenesis. Gazz Med Ital 1972; 131:251-255.

Bondy PK. The adrenal cortex. In Metabolic control and disease, eighth edition, 1980; 1427-1499. Edited by Bondy, PK, Rosenberg LE, Philadelphia, PA: WB Saunders Co.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992; 101:1644-1655.

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest 1997;112:235-243.

Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Ann Intern Med. 1996;125:680-687.

Bone RC. Why new definitions of sepsis and organ failure are needed. Am J Med. 1993;95:348-350.

Bone, R. C. The pathogenesis of sepsis, Ann.Intern.Med 1991; 115: 457-469.

Bone, R.C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit. CareMed 1996; 24, 1125–1128

Borchi E, Bargelli V, Guidotti V, Berti A, Stefani M, Nediani C, Rigacci S. Mild exposure of RIN-5F  $\beta$ -cells to human islet amyloid polypeptide aggregates upregulates antioxidant enzymes via NADPH oxidase-RAGE: an hormetic stimulus. Redox Biol. 2013;2:114-22.

Borges, F.; Fernandes, E.; Roleira, F. Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. Current Medicinal Chemistry, Volume 9, Number 2, 2002; (23):195-217.

Borgström L, kagedal D, Oaulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. Eur J Clin Pharmacol 1986; 31:217-222.

Borkan GA, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. J Gerontol 1980; 35:177-184.

Borovikova, L.V. et al. Role of vagus nerve signaling in CNI- 1493-mediated suppression of acute inflammation. Auton. Neurosci 2000; 85, 141–147.

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardó FV, Mann GE, Viña J. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes:

involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. FASEB J. 2006;20(12):2136-8.

Box H.C, J.B. Dawidzik, and E.E Budzinski. Free radical-induced double lesions in DNA. Free Radic. Biol. Med 2001; 31: 856-868.

Brade, H., Brade, L., Schade, U., Zähringer, U., Holst, O., Kuhn, H. M., Rozalski, A., Rohrscheidt, E., y Rietschel, E. T. Bacterial Endotoxins: Pathophysiological Effects, Clinical Significance and Pharmacological Control, Progress in Clinical Biological Research. Levin, J., van Deventer, S. J. H., y Sturk Eds. (Alan R. Liss, New York, ed. 1) 1988; pp. 17-45.

Brade, L., Brandenburg, K., Kuhn, H. M., Kusumoto, S., Macher, I., Rietschel, E. T., Brade, H. The immunogenicity and antigenicity of lipid A are influenced by its physicochemical state and environment, Infect.Immun 1987; 55: 2636-2644 .

Brandenburg, K., Koch, M. H., Seydel, U. Phase diagram of lipid A from Salmonella minnesota and Escherichia coli rough mutant lipopolysaccharide, J.Struct.Biol 1990; 105: 11-21 .

Brandenburg, K., Lindner, B., Schromm, A., Koch, M. H., Bauer, J., Merkli, A., Zbaeren, C., Davies, J. G., Seydel, U. Physicochemical characteristics of triacyl lipid A partial structure OM- 174 in relation to biological activity, Eur.J.Biochem 2000; 267: 3370-3377.

Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. J Exp Med. 1996;184:51-60.

Brannon L. and Feist J. Health psychology. An introduction to behavior and health. Wadsworth Publishing Company, Belmont, 1992.

Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Lancet 2002; 360: 219-23.

Briest W, H'olz A, Rassler B, Deten A, Leicht M, Baba HA & Zimmer HG. Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. Cardiovasc Res 2001;52, 265-273.

Brohee D, Neve P. Effect of dietary high doses of vitamin E on the cell size of T and B lymphocyte subsets in young and old CBA mice. Mechanisms of Ageing and Development. 1995; 85:147-159.

Brousseau P1, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Fournier M. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam Mya arenaria hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. Toxicology. 2000;142(2):145-56.

Brown MA and Jones WK. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci* 2004; 9: 1201–1217.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 617-624 21.

Bulger EM, Maier RV. An argument for vitamin E supplementation in the management of systemic inflammatory response syndrome. *Shock* 2003; 19(2):99-103.

Burch JB, et al. Advances in geroscience: Impact on healthspan and chronic disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(Suppl 1):S1–S3.

Burke, Anne; Smyth, Emer; FitzGerald, Garret A. «Autacoides: farmacoterapia de la inflamación». Goodman And Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics. México: The McGraw-Hill 2006; p. 694.

Burton, G. W., Joyce, A., Ingold, K. U. Is vitamin E the only lipid-soluble, chainbreaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?, *Arch.Biochem.Biophys* 1983; 221: 281-290 .

Cadenas, E. Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu.Rev.Biochem* 1989; 58: 79-110 .

Calabrese E. Hormesis: Changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutat. Res* 2002; 511:181-189.

Calabrese E. Neuroscience and Hormesis: Overview and General Findings. *Crit Rev Toxins* 2008; 38 (4):249-252.

Calabrese E.J and Baldwin L.A. The effects of gamma rays on longevity. *Biogerontology* 2000; 1:309-319.

Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol* 1997;17(1):77-88.

Calandra, T. Bernd Echtenacher, Didier Le Roy, Jérôme Pugin, Christine N. Metz, Lothar Hültner, Didier Heumann, Daniela Männel, Richard Bucala<sup>6</sup> & Michel P. Glauser<sup>1</sup> Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 2000; 6, 164–170.

Calder PC. N-3 fatty acids, inflammation, and immunity-relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids* 2004; 39(12):1147-1161.

Cano, M. J., Soriano, J., Monturiol, J., Garcia-Dorado, D., Desco, M., Del Cañizo, F. J., Garcia-Barreno, P. *Eur.Surg.Res* 1988; 20: 108-112 .

Caroff Martine, Doris Karibian, Jean-Marc Cavaillon, Nicole Haeffner-Cavaillon. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharide. *Microbes and Infection* 2002;4:915-926.

Caroff, M., Bundie, D. R., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. and Duncan, J. R. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect. Immun.*1984; 46 :384-389.

Carson SD, Johnson DR. Consecutive enzyme cascades: complement activation at cell surface triggers increased tissue factor activity. *Blood* 1990; 76: 361-367.

Cascales M. Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid. ISBN 84-85559-54-1. 1999.

Cascales M. Inmunosenescencia. En: Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid 1999; pp 169-192.

Castanedo C, García M, Noriega MJ, Quitanilla M. Consideraciones Generales sobre el Envejecimiento. Seeg 1999. Documentos/libros/temas cap1:1-15.

Catalá Rodríguez Myriam. Mecanismos Bioquímicos del Shock Endotóxico: Respuesta Hepática al Estrés Oxidativo. ISBN: 84-669-1816-7 UCM. 2002.

Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006;10:233.

Cavaillon JM. "Septic Plasma": an immunosuppressive milieu. *Am J Respir Crit Care Med*.2002;166:1417-1418.

Cavaillon JM. The nonspecific nature of endotoxin tolerance. *Trends Microbiol*. 1995;3:320-324.

Cavanagh, D., Rao, P. S., y Comas, M. R., (1977) Major Problems in Obstetrics and Gynecology. Saunders, W. B. Philadelphia 1977; pp. 1-129.

Cavassani KA, Carson WF 4th, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, Lindell DM, Dou Y, Lukacs NW, Keshamouni VG, Hogaboam CM, Kunkel SL. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood* 2010; 115(22):4403-11.

Ceci R, Beltran Valls MR, Duranti G, Dimauro I, Quaranta F, Pittaluga M, Sabatini S, Caserotti P, Parisi P, Parisi A, Caporossi D. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training. *Redox Biol* 2013; 12(2C):65-72.

Center for Disease Control. Clinical Sepsis and death in a newborn nursery associated with contaminated parenteral medications. Brazil, 1996, *MMWR* 1998; 47: 610-2 .

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605 .

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.

chchannaoui H, Frei K, Letiembre M, Strieter RM, Adachi Y, Landmann R: Cd14 deficiency leads to increased mip-2 production, cxcr2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. *J Leukoc Biol* 2005;78:705-715.

Check J, Byrd CL, Menio J, Rippe RA, Hines IN, Wheeler MD. Src kinase participates in LPS-induced activation of NADPH oxidase. *Mol Immunol*. 2010;47(4):756-62.

Cheda A, J. Wrembel-Wargocka, E.M. Nowosielska, M.K. Janiak. Stimulatory effects of single low-level irradiations with X-rays on functions of murine peritoneal macrophages, *Nukleonika* 2005;50 S13-S16.

Chen J.J, Yu B.P. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic.Biol Med*. 1994; 17:411-418

Chiller, J. M., Skidmore, B. J., Morrison, D. C., Weigle, W. O. Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvant activity, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1973; 70: 2129-2133 .

Cino M, Del Maestro R. Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: The effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 269:623-638.

Clanton R, Saucier D, Ford J, Akabani G. Microbial influences on hormesis, oncogenesis, and therapy: A review of the literature. *Environ Res*. 2015;142:239-56.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-891.

Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, Di Lorenzo G, Listi F, Vitello S. Memory B cells subpopulations in the aged. *Rejuvenation Res* 2006; 9:149-152.

Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Scialabba G, Candore G, Lio D, Motta M, Malaguarnera M, Caruso C. B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* 2003; 124:389- 93.

Comfort A. Test-battery to measure ageing-rate in man. *Lancet*. 1969;2:1411-4.

Comfort, A. Ageing, *The Biology of Senescence* (Routledge and Kegan Paul, London, 1964.

Correa R, Blanco B, Del Río M, Victor V, Guayerbas N, Medina S. Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* 1999; 10: 195-200.

Crimi, E. et al. Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction. *Free Radic. Res.* 2006; 40, 665–672.

Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. A higher anxiety state in old rats after social isolation is associated to an impairment of the immune response. *J Neuroimmunol* 2014; 277: 18-25.

Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr Pharm Des* 2014a; 20: 4608-28.

Cunneen J, Cartwright M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. *AACN Clin Issues* 2004; 15(1):18-44.

Curnutte, J. T. y Babior, B. M. Chronic granulomatous disease, *Adv.Hum.Genet* 1987; 16:229-297 .

Cypser J.R and Johnson T.E. Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J. Gerontol. Biol. Sci* 2002; 57A:B109-B114.

Czapski G y Goldstein S. The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach. *Free. Radic. Biol. Med.* 1995; 19(6):785-794.

D.H. Lewis, D.L. Chan, D. Pinheiro, E. Armitage-Chan, and O.A. Garden The Immunopathology of Sepsis: Pathogen Recognition, Systemic Inflammation, the Compensatory Anti-Inflammatory Response, and Regulatory T Cells *J Vet Intern Med* 2012;26:457–482

Dahlke K, Wrann CD, Sommereld O, et al. Distinct different contributions of the alternative and classical complement activation pathway for the innate host response during sepsis. *J. Immunol* 2011 186(5): 3066-3075.

Damas P, Reuter A, Gysen P, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 1989;17:975–978.

Danner, R. L., Elin, R. J., Hosseini, J. M., Wesley, R. A., Reilly, J. M., Parillo, J. E. (1991) Endotoxemia in human septic shock, *Chest* 99: 169-175.

David Male, Jonathan Brostoff, David Roth, Ivan Roitt. *Immunology*. Elsevier 2007; 14:257-276.

Davies KJ, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem.* 1987;262(20):9908–9913.

Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 1987;262(20):9895–9901.

Dawson CW, Ledgerwood AM, Rosenberg JC, Lucas CE. Anergy and altered lymphocyte function in the injured patient. *Am Surg.* 1982;48:397-401.

De Boer JP, Creasey AA, Chang A, Roem D, Eerenberg AJ, Hack CE, Taylor FB Jr. Activation of the complement system in baboons challenged with live *Escherichia coli*: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern. *Infect. Immun* 1993; 61: 4293–4301.

De Flora S, Cesarone C.F, Balansky R.M. Chemoprotective properties and mechanism of N-acetylcysteine. The experimental background. *J.Cell. Biol* 1995; 22:33-41.

De Flora S, Izzeti A, D'Angostini F, Cesarone C.F. Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am.J.Med* 1991; 91:122-130.

De la Fuente del Rey Mónica. Efecto del envejecimiento en el sistema inmunitario. *Envejecer con Salud*. Tomás Ortiz Alonso Edit Planeta 2007; pp 65-87.

De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E. Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3966-93.

De la Fuente M, Miquel J. Efecto protector de antioxidantes tiólicos en la inmunodepresión asociada al envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 1994; 29: 246-251.

De la Fuente M, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 49-54.

De la Fuente M, Víctor VM: Ascorbic acid and n-acetylcysteine improve in vitro the function of lymphocytes from mice with endotoxininduced oxidative stress. *Free Rad Res* 35: 73–84, 2001

De La Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1985;81(4):935-8.

De la Fuente M. Desarrollo de la Respuesta del Sistema Inmunitario. En: *Fisiología Humana*. JAF Tresguerres (ed.). 2010 Pp: 353-373. 4ta edición McGraw Hill. México.

De la Fuente M. El sistema inmunitario y el envejecimiento. En: *Medicina estética y Anti envejecimiento*. JAF Tresguerres (ed.). 2012; Pp: 629-645. 1ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid.

De la Fuente M. Envejecimiento del sistema inmunitario. En: *Biogerontología Médica*. Sastre J, Pamplona R, Ramón RJ (eds). 2009a; Pp: 135-152. Ergon. Madrid.

De la Fuente M. Funcionamiento del sistema inmunitario. En: Inmunonutrición. En la Salud y la enfermedad. A. Marcos (ed.). 2011; Pp: 2-25. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid.

De la Fuente M. Gerontología en España. En: El estado de España. Real Academia de Doctores de España. Ed. Borealia Asesores Editoriales, SL. 2005; 29-48. Barcelona.

De la Fuente M. Inmunosenescencia. En: Tratado de Medicina Geriátrica. Abizanda P (ed.). 2014. Pp:134-141. Elsevier España.

De la Fuente M. Role of neuroimmunomodulation in aging. Neuroimmunomodulation 2008; 15: 213-23.

De la Fuente M. Teorías del envejecimiento “En: retos de la nutrición en el Siglo XXI ante el envejecimiento Poblacional. Varela G, Alonso E (eds) 2009b. Pp: 29-48. Instituto Tomás Pascual Sanz y Universidad San Pablo CEU. Madrid.

De la Fuente M. The immune system, a marker and modulator of the rate of aging. En: Massoud A, Rezaei N, Eds. Immunology of Aging. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2014; pp. 3-23.

De la Fuente, M., Hernánz, A., Guayerbas, N., Álvarez, P., Alvarado, C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. Cell Mol. Biol 2004; 50: OL683-OL690.

De Toda IM, De la Fuente M. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. Biogerontology. 2015;16(6):709-21.

Dean, R. T., Thomas, S. M., Garner, A. Free-radical-mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Roles for lipid radicals, Biochem.J 1986; 240: 489-494 .

Deans KJ, Haley M, Natanson C, Eichacker PQ, Minneci PC. Novel therapies for sepsis: a review. J Trauma. 2005;58:867-874.

Declue AE, Delgado C, Chang CH, et al. Clinical and immunologic assessment of sepsis and the systemic inflammatory response syndrome in cats. J Am Vet Med Assoc 2011;238:890–897.

Del Maestro, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology, Acta Physiol Scand.Suppl 1980; 492: 153-168 .

Del Rey A, Welsh CJ, Schwarz MJ, Besedovsky HO. Neuroimmunomodulation in health and disease. Ann N Y Acad Sci 2012; 1262:vii-viii.

Delano MJ, Thayer T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, Cuenca AG, Warner E, Walle SM, Walle MA, O'Malley KA, Ramphal R, Clare-Salzer M, Efron PA, Mathews CE, Moldawer LL. Sepsis induces early alterations in innate



immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol* 2011; 186(1):195-202.

Delano, M.J. et al. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J. Immunol* 2011; 186, 195–202.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41:580-637.

Dellinger, R. Cardiovascular management of septic shock. *Critical Care Medicine* 2003; Volume 31. Number 3.

Devrim E, Avci A, Ergüder IB, Karagenç N, Külâh B, Durak I. Activities of xanthine oxidase and superoxide dismutase enzymes in rat intestinal tissues in sepsis. *J Trauma*. 2008;64(3):733-5.

Differences between rats and mice in the immunosuppressive activity of 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid. *Toxicology*. 1992 ;74(1):57-67.

Ding Q, Vayman S, Souda P, Whitelegge J.P, and Gomez Pinilla F. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *Eur. J. Neurosci* 2006; 24:1265-1276.

Ding Y, Chung CS, Newton S, et al. Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. *Shock* 2004; 22:137-144.

Dino Demirovic, Irene Martinez de Toda, Carine Nizard, and Suresh I. S. Rattan. Differential translocation of heat shock factor-1 after mild and severe stress to human skin fibroblasts undergoing aging in vitro *J Cell Commun Signal* 2014; 8(4): 333–339.

Djillali Annane, Eric Bellissant, Jean-Marc Cavaillon. Septic shock. *The Lancet*. 2005; 365 (9453):63-78.

Dolci GS, Vey LT, Schuster AJ, Roversi K, Roversi K, Dias VT, Pase CS, Barcelos RC1, et al. Hypoxia acclimation protects against oxidative damage and changes in prolactin and somatolactin expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to manganese. *Aquat Toxicol*. 2014;157:175-85.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35: 1244-1250.

Doroshov J y Hochstein P. Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases. *Pathology of Oxygen*. New York, Academic Press. 1982; 245-253.

- Drögue W. Oxidative stress and aging: En Hypoxia: Through the lifecycle. Roach RC, Vagner PD, Anckel PH, editors. NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers 2003; pp:191-200.
- Dutton, PL; Ohnishi, T; Darrouzet, E; Leonard, MA; Sharp, RE; Cibney, BR; Daldal, F; Moser, CC. 4 Coenzyme Q oxidation reduction reactions in mitochondrial electron transport. En Kagan VE, Quinn PJ (editors). Coenzyme Q: Molecular mechanisms in health and disease. Boca Raton: CRC Press 2000; pp. 65–82.
- Ellouze O, Frikha N, Ouerghi S, et al. N-acetylcysteine in septicshock. Tunis Med 2011; 89(10): 738-44.
- Elmqvist JK, Scammell TE & Saper CB. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. Trends Neurosci 1997; 20, 565–570.
- Ely EW, Angus DC, Williams MD, Bates B, Qualy R, Bernard GR. Drotrecogin alfa (activated) treatment of older patients with severe sepsis. Clin Infect Dis 2003; 37: 187-195.
- Emerit J, Edeans M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomed Pharmacother 2004; 58:39-46.
- Ernster L, Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function . Biochimica et Biophysica Acta 1995; 1271 (1): 195–204.
- Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O. Modification of human low density lipoprotein by lipid peroxidation, Basic Life Sci. 1988; 49: 369-373 .
- Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. J Endotoxin Res. 2004;10:71-84.
- Feng L, Sun W, Xia Y, et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. Arch Biochem Biophys 1993; 307: 361-8.
- Fenton HJH . Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. J. Chem. Soc. Trans 1894; 65:899-910.
- Ferrández MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M., 1999 Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. Exp Gerontol. 1999 Aug;34(5):675-85.
- Ferrara JL. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. Curr Opin Immunol. 1993;5:794-799.
- Fietta A, Merlini C, Dos Santos C, Rovida S, Grassi C. Influence of aging on some specific and nonspecific mechanisms of the host defense system in 146 healthy subjects. Gerontology 1994; 40, 237–245.

Fischer E, Van Zee KJ, Marano MA, et al. Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood* 1992;79:2196-2200.

Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol* 2007;21(6):1267-80.

Flierl MA, et al. Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis. *FASEB J* 2008; 22: 3483-3490.

Flierl MA, Schreiber H, Huber-Lang MS. The role of complement, C5a, and its receptors in sepsis and multiorgan dysfunction syndrome. *J. Invest. Surg* 2006; 19: 255-265.

Flores, J. M., Jimenez, P. I., Rincon, M. D., Marquez, J. A., Navarro, H., Arteta, D., Murillo, F. Early risk factors for sepsis in patients with severe blunt trauma, *Injury* 2001; 32: 5-12 .

Fonanger J, Beedholm R, Clark B.F.K, Rattan S.I.S. Mild- stress induced stimulation of heat shock synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp. Gerontol.* 2002; 37:1223-1238.

Forman, H. J. y Fisher, A. B. Oxygen and living process. Gilbert, D. L. Eds. (Springer-Verlag, New York), 1981; p. 65.

Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol.* 2009;130:7-15.

Fox, E. S., Broitman, S. A., Thomas, P. Bacterial endotoxins and the liver, *Lab Invest* 1990; 63: 733-741 .

Fox, E. S., Thomas, P., Broitman, S. A. Uptake and modification of lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells, *Hepatology* 1988; 8: 1550-1554 .

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 2000; 18:1717-20. 21.

Frank, L., Yam, J., Roberts, R. J. The role of endotoxin in protection of adult rats from oxygen-induced lung toxicity, *J.Clin.Invest* 1978; 61: 269-275 .

Freeman BA Y Crapo J. Biology of disease: Free radicals and tissue injure. *Lab. Invest* 1982; 47:412-426.

Frei B. Reactive oxygen species an antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med* 1994; 97(3A):5S-13S.

Fridovich I (1978): The biology of oxygen radicals. *Science.* 201:875-880.

- Fritsma, G. A. Vitamin E and autoxidation, *Am.J.Med.Technol.* 1983; 49: 453-456 .
- Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 2003;100:171-194.
- Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol* 2002; 2: 346–353.
- Fusco D, Colloca G, Lo Monaco M, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, 2 2007; (3): 377-387.
- Gądek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Bugajski J. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacol Rep* 2013;65(6):1655-62.
- Gaillard PJ, de Boer AB & Breimer DD. Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro. *Microvasc Res* 2003; 65, 24–31.
- Galeotti, T., Borrello, S., y Masoti, L. Oxygen radicals: systemic events and disease processes. Das, E. Eds. (Karger, Basel) 1990; pp. 129-148.
- Ganter MT et al. Role of the alternative pathway in the early complement activation following major trauma. *Shock.* 2007; 28: 29-34.
- Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russell SW, Murphy WJ. Autocrine/paracrine IFN- $\alpha$  mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 $\alpha$  in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 $\alpha$  in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol* 1998;161:4803- 4810.
- Garcia-Barreno, P. y Balibrea, J. L. Metabolic response in shock, *Surg.Gynecol.Obstet* 1978; 146: 182-189.
- Garcia-Barreno, P., Balibrea, J. L., Aparicio, P. Blood coagulation changes in shock, *Surg.Gynecol.Obstet* 1978a; 147: 6-12 .
- Garvy BA, King LE, Telford WG, Morford LA Fraker PJ. Chronic elevation of plasma corticosterone causes reductions in the number of cycling cell of the lineage murine bone marrow and induces apoptosis. *Immunology* 1993;80(4):587-92.
- Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol. Immunol* 2004; 41: 1089-1098.
- Gayoso I, Sanchez-Correa B, Campos C, Alonso C, Pera A, Casado JG, Morgado S, Tarazona R, Solana R. Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun* 2011;3(4):337-43

Gheorghiuță, Alina Elena Barbu , Monica Livia Gheorghiu , Florin Alexandru Căruntu. Endocrine dysfunction in sepsis: a beneficial or deleterious host response? *Germes* 2015;5(1):17-25.

Ghosh CC, Thamm K, Berghelli AV, Schrimpf C, Maski MR, Abid T, Milam KE, Rajakumar A, Santel A, Kielstein JT, Ahmed A, Thickett D, Wang K, Chase M, Donnino MW, Aird WC, Haller H, David S, Parikh SM. Drug Repurposing Screen Identifies Foxo1-Dependent Angiopoietin-2 Regulation in Sepsis. *Crit Care Med* 2015; 43(7):230-40.

Ghuysen J.M; Hakenbeck R. Bacterial Cell Wall. Elsevier Science 1994; Cap 1.

Giacconi R, Cipriano C, Muti E, et al. Involvement of -308 TNF-alpha and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients. *Biogerontology*. 2006;7:347-56.

Gibson, B. W., Webb, J. W., Yamasaki, R., Fisher, S. J., Burlingame, A. L., Mandrell, R. E., Schneider, H., and Griffiss, J. M. Structure and heterogeneity of the oligosaccharides from lipopolysaccharides of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; 86:17-21.

Giménez-Llort L, García Y, Buccieri K, Revilla S, Suñol C, Cristofol R, Sanfeliu C. Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Response to Treadmill Exercise in 3xTg-AD Mice. *Int J Alzheimers Dis*. 2010;2010:128354

Giménez-Llort, L., A. Fernández-Teruel, et al. "Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate." *Eur J Neurosci* 2002; 16(3): 547-550.

Giménez-Llort, L., Fernández-Teruel, A., Escorihuela R.M., Fredholm, B.B., Tobeña, A., Pekín, M., Johansson, B. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci* 2002;16: 547-550.

Girardin E, Grau GE, Dayer JM, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* 1988;319:397-400.

Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology*. 1992;76:20-23.

Goldman DP, et al. Substantial health and economic returns from delayed aging may warrant a new focus for medical research. *Health Aff (Millwood)* 2013; 32(10):1698-1705.

Gomez Pinilla Fernando. The influences of diet and exercise on mental health through hormesis. *Ageing Research Reviews* 2008; 7:49-62.

Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction in early endotoxemia. *Intens Care Med* 1995; 24:1257-1263.

Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with sepsis and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995; 23:646-51.

Gosálvez M, Vivero C, Álvarez I. Restoration of "contact inhibition" in tumour cells in tissue culture by treatment with thiazolidine 4 carboxylic acid. *Biochem Soc Transact* 1979; 7:191-192.

Gostner JM, Becker K, Fuchs D, Sucher R. Redox regulation of the immune response. *Redox Rep.* 2013;18(3):88-94.

Gram, HC . «Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten». *Fortschr. Med.* 1884; 2: 185–189.

Grieb G, Kim BS, Simons D, Bernhagen J, Pallua N. MIF and CD74 - suitability as clinical biomarkers. *Mini Rev Med Chem* 2014;14(14):1125-31.

Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: G315-G321.

Grubeck-Loebenstien B, Wick G. The aging of the immune system. *Adv Immunol* 2002; 80:243–84.

Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol.* 2002;37(2-3):249-56

Guayerbas N. Cambios con la edad en la función inmune en un modelo murino de envejecimiento prematuro. Efecto de los antioxidantes. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid 2003.

Haber F y Weiss J. The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London* 1934;147:332-351.

Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 5):891-5.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th edition. Oxford University Press; 2006; p704.

Halliwell B . Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 1994; 344:721-724.

Halliwell B y Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Press, Reino Unido 1989.

Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts, FASEB J 1987; 1: 358- 364 .

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, Biochem.J 1984; 219: 1-14 .

Hampson DR, Manalo JL. The activation of glutamate receptors by kainic acid and domoic acid. Nat Toxins 1998;6:153–158.

Harding JJ, Blakytini R, Ganea E. Glutathione in disease. Biochem Soc Trans 1996; 24: 881-884.

Harman D. Role of free radicals in aging and disease. Ann. N. Y. Acad Sci. USA 1992; 673: 126-141

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell 1988; 52: 269–279.

Hashmi MZ1, Khan KY, Hu J, Naveedullah, Su X, Abbas G, Yu C, Shen C. Hormetic effects of noncoplanar PCB exposed to human lung fibroblast cells (HELFI) and possible role of oxidative stress. Environ Toxicol. 2014; 22008.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell 2008;132:344-362.

Hayflick, L. The future of ageing. Nature 2000; 408(6809):267–269.

Haynes L, Eaton SM, Swain SL. Effect of age on naive CD4 responses: impact on effector generation and memory development. Springer Semin Immunopathol 2002; 24: 53-60.

Hayter, J. B., Rivera, M., McGroarty, E. J. Neutron scattering analysis of bacterial lipopolysaccharide phase structure. Changes at high pH, J.Biol.Chem. 1987; 262: 5100-5105.

Hazeki K, Nigorikawa K, Hazeki O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. Biol Pharm Bull 2007;30(9):1617-23.

Heagy W, Hansen C, Nieman K, et al. Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify "septic" intensive care unit patients. Shock. 2000;14:271-277.

Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, Jaworowski A, Crowe SM. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. Aging Cell 2012; 11, 867–875.

Heffernan DS, Monaghan SF, Chung CS, Cioffi WG, Gravenstein S, Ayala A. A divergent response of innate regulatory T-cells to sepsis in humans: circulating invariant natural killer T-cells are preserved. *Hum Immunol* 2014; 75(3):277-82.

Heffernan DS, Monaghan SF, Thakkar RK, Tran ML, Chung CS, Gregory SH, Cioffi WG, Ayala A. Inflammatory mechanisms in sepsis: elevated invariant natural killer T-cell numbers in mouse and their modulatory effect on macrophage function. *Shock* 2013;40(2):122-8.

Hercus M.J, Loeschcke V, Rattan S.I.S. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* 2003; 4:149-156.

Hernández-Urzúa M, Alvarado-Navarro A. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev. Biomed* 2001; 12:272-280.

Hinshaw, L. B. y Crankshaw, D. L. The fundamental Mechanisms of Shock. Hinshaw, L. B. y Cox, B. G. Eds. Plenum Press, New York 1972.

Hinshaw, L. B., Beller-Tood, B. K., Archer, L. T., Peyton, M. D. en Handbook of shock and trauma, Altura, B. M., Ed. Raven Press, New York 1983.

Hirsh T, Metzig M, Niederbichler A, et al. Role of host defense peptides of the innate immune response in sepsis. *Shock* 2008; 30(2): 117-126.

Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm.* 2012; 315941.

Hitchcock, P. J., Leive, L., Makela, P. H., Rietschel, E. T., Strittmatter, W., Morrison, D. C. (1986) Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future, *J.Bacteriol.* 166: 699-705.

Holliday R. A re-examination of the effects of ionizing of radiation on lifespan and transformations of human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.*1991; 256:295-302.

Hotchkiss R. Karl I. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *The New England Journal of Medicine.* 2003; 348 (2). 138-150.

Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med.* 2009;15:496-497

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002; 168:2493-2500.

Hsiao CC, Chen PH, Cheng CI, Tsai MS, Chang CY, Lu SC, Hsieh MC, Lin YC, Lee PH, Kao YH. Toll-like receptor-4 is a target for suppression of proliferation and chemoresistance in HepG2 hepatoblastoma cells. *Cancer Lett* 2015; pii: S0304-3835(15)00533-9.



Hu S, Zhang LJ, Bai HY, Bao CM.[The effects of electro-acupuncture at Zusanli point on intestinal proinflammatory factors, diamine oxidase and tissue water content in rats with sepsis]. *Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2009;21(8):485-7.

Hu S, Zhang LJ, Bai HY, Bao CM.[The protective effects of carbachol on visceral ischemia-induced lipid peroxidation injury in rats with sepsis]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2009;21(9):552-4.

Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, Gwak GY, Caviglia JM, Mu X, Loike JD, Jenkins RE, Antoine DJ, Schwabe RF.The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. *J Clin Invest*. 2015;125(2):539-50.

Ikeda K, Nagasawak, Hourichi T, et al. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb. Haemost* 1997; 77: 394-398.

Ingalls R.R, Arnaout M.A, Delude R.L. The CD11/CD18 integrins: Charaterization of three novel LPS signaling receptors. *Prog. Clin. Biol. Res* 1998; 397-1007.

Instituto Nacional de Estadística. Demografía y población. Cifras oficiales de población: Padrón municipal. Madrid: INE 2011.

James R Cypser, Pat Tedesco, and Thomas E Johnson. Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontology* 2006; 41(10):935-939.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.

Jang SI, Hardie LJ, Secombes CJ. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *Journal of Leukocyte Biology* 1995;57:943-7.

Jensen GL, McGee M, Binkley J. Nutrition in the elderly. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 313-334 19

Ji, L.L. Oxidative stress and antioxidative defense: effects of aging and exercise. In: Alessio, H.M; Hagerman, A.E. (eds), *Oxidative Stress, Exercise and aging*. Imperial College Press 2006; Pp.85-108.

Jia L, He X, Chen W, Liu Z, Huang Y, Yu S. Hormesis phenomena under Cd stress in a hyperaccumulator--*Lonicera japonica* Thunb. *Ecotoxicology*. 2013;22(3):476-85.

Jia SH, Li Y, Parodo J, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 2004;113:1318-1327.

Joanelle Z. Lugo, Sarah Price, Julia E. Miller, Itzhak Ben-David, Vija J. Merrill, Peter Mancuso, Jason B. Weinberg and John G. Younger. LIPOPOLYSACCHARIDE O-

ANTIGEN PROMOTES PERSISTENT MURINE BACTEREMIA. SHOCK, 2007; Vol. 27, No. 2, pp. 186-191.

Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., Poelchen, W., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.J., Hårdemark, A., Betsholtz, C., Herlenius, E., Fredholm, B.B. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 9407-9412.

Jones GE, Allen WE, Ridley AJ. The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis. *Cell Adhes Commun* 1998;6(2-3):237-45.

Jones GE. Cellular signaling in macrophages migration and chemotaxis. *Journal of leukocyte Biology* 2000; 68:593-635.

Jones S, F. McArdle, C. I. A. Jack, M. J. Jackson, Effect of antioxidant supplement on the adaptive response of human skin fibroblasts to UV-induced oxidative stress. *Redox Report* 1999; 4: 291-299

Jones, D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002; 384: 93-112.

Juhasz B, Mukherjee S, Dipak K Das. Hormetic response of resveratrol against cardioprotection. *Exp Clin Cardiol* 2010; 15(4):e134-e138.

Jungi TW, Besedovsky HO, Sorkin E, Schardt M. Hormonal control of neutrophil chemotactic activity in the rat vagina. *Am J Physiol* 1977; 233(1):R59-65.

Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of nf-kappa $\beta$  activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(3-4):395-403.

Karin M, Lin A. NF-Kappa $\beta$  at the crossroads of the life and death. *Nat Immunol*, 2002, 3(3):221-7.

Kastowski, M., Gutberlet, T., and Bradaczek, H. Molecular modeling of the three dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 1992; 174:4798-4806.

Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, et al. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock*. 2006; 26:254-261.

Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 2014;311(13):1308-16.

Kawano T, Kunz A, Abe T, Girouard H, Anrather J, Zhou P, Iadecola C iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(8):1453-62.

Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A & Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26, 1257–1263.

Kensler, T.W. and Wakabayashi, N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 2010; 31, 90–99.

Khazaeli A.A, Tatar M, Pletcher S.D, Curtsinger J.W. Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 1997; 52A: B48-B52.

Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007; 130: 906–917.

Kim JS, Lee YH, Choi DY, Yi HK. Expression of Heat Shock Proteins (HSPs) in Aged Skeletal Muscles Depends on the Frequency and Duration of Exercise Training. *J Sports Sci Med* 2015;14(2):347-53.

Kirkman, H. N., Galiano, S., Gaetani, G. F. The function of catalase-bound NADPH, *J.Biol.Chem* 1987;262: 660-666.

Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age?. *Nature* 2000; 408:233-238.

Kirkwood TBL, Rose MR. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Phil Trans R Soc London B* 1991; 332(1262):15-24.

Kirkwood TBL. Gerontology: Healthy old age. *Nature* 2008; 455: 739-23.

Kirkwood, T.B.L. Biological theories of aging: an overview. *Aging (Milano)* 1998;10, 144-146

Klabunde RE, Costo AF. Nitric oxide synthase inhibition does not prevent cardiac depression in endotoxic shock. *Shock*, 1995; 3:73-78.

Klasen C, Ohl K, Sternkopf M, Shachar I, Schmitz C, Heussen N, Hobeika E, Levit-Zerdoun E, Tenbrock K, Reth M, Bernhagen J, El Bounkari O. MIF promotes B cell chemotaxis through the receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 signaling. *J Immunol* 2014;192(11):5273-84.

Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF alpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther.* 2010;127:295-314.

Komuro, T., Murai, T., Kawasaki, H. (1987) Effect of sonication on the dispersion state of lipopolysaccharide and its pyrogenicity in rabbits, *Chem.Pharm.Bull (Tokyo)* 1987; 35: 4946- 4952 .

Kong XN, Yan HX, Chen L, Dong LW, Yang W, Liu Q, Yu LX, Huang DD, Liu SQ, Liu H, Wu MC, Wang HY. LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein {alpha} contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med*. 2007 Oct 29;204(11):2719-31.

Kong, X. et al. Enhancing Nrf2 pathway by disruption of Keap1 in myeloid leukocytes protects against sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2011;184, 928–938.

Königs V, Jennings R, Vogl T, Horsthemke M, Bachg AC, Xu Y, Grobe K, Brakebusch C, Schwab A, Bähler M, Knaus UG, Hanley PJ. Mouse macrophages completely lacking Rho subfamily GTPases (RhoA, RhoB, and RhoC) have severe lamellipodial retraction defects, but robust chemotactic navigation and altered motility. *J Biol Chem* 2014; 289(44):30772-84.

Kono, Y. y Fridovich, I. Superoxide radical inhibits catalase, *J.Biol.Chem.*1982; 257: 5751-5754 .

Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25(3):321-7.

Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2012 Jun;25(3):321-7.

Kovach, A. G. B., Stoner, H. B., y Spitzer, J. J. Neurohormonal and Metabolic Aspects of Injury Eds. Plenum Press, New York 1973.

Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways.

Kozinska A, Guz L. The effect of various *Aeromonas* bacterium vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 2004; 16:437-4

Krabbe KS, Bruunsgaard H, Qvist J, Hansen CM, Møller K, Fonsmark L, Madsen PL, Kronborg G, Frandsen U, Andersen HØ, Skinhøj P, Pedersen BK. Hypotension during endotoxemia in aged humans. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18: 572-575.

Kramer A.F, Hahn S, Cohen N.J, Banich M.T, McAuley E, Harrison C.R, Vakil E, Bardell L, Boileau R.A, Colombe A. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 1999; 400:418-419.

Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958 30

Kurihara T, Jones CN, Yu YM, Fischman AJ, Watada S, Tompkins RG, Fagan SP, Irimia D. Resolvin D2 restores neutrophil directionality and improves survival after burns. *FASEB J* 2013; 27(6):2270-81.

- Kurowska E, Majkutewicz I. The interleukin-10 in the central nervous system. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2015; 69(0):886-91.
- L. de Saint-Georges, Low-dose ionizing radiation exposure: Understanding the risk for cellular transformation. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 96 100
- L. E. Feinendegen, V. P. Bond, C. A. Sondhaus, H. Muehlensiepen, Radiation effects induced by low doses in complex tissue and their relation to cellular adaptive responses. *Mutat Res* 1996; 358 199 205
- Labischjnski, H. L., Barnickel, G., Bradaczek, H., Naumann, D., Rietschel, E. T. and Giesbrecht, P. High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeations barrier property of the outer membrane. *J. Bacteriol.* 1985; 162:9-20.
- Landriscina M, Maddalena F, Laudiero G, Esposito F. Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxidant Redox signal* 2009; 11: 2701-2716.
- Lang CH, Nystrom G, Frost RA. Betaadrenergic blockade exacerbates sepsis-induced changes in tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in skeletal muscle and is associated with impaired translation initiation. *J Trauma* 2008; 64:477-486.
- László M. Hoesel, Peter A. Ward. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2004; Vol. 1, No. 3.
- Lawrence DT, Kirk MA. Chemical terrorism attacks: Update on antidotes. *Emerg Med Clin North Am* 2007;25:567-595.
- Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 2001;7:1291-1297.
- Lee W, Kwon OK, Han MS, Lee YM, Kim SW, Kim KM, Lee T, et al. Role of moesin in HMGB1-stimulated severe inflammatory responses. *Thromb Haemost.* 2015 ;114(2):350-63.
- Lefréré J.J and Berche P. Doctor Brown-Sequard's therapy. *Ann Endocrinol.* 2010; 71 (2): 69-75.
- Leiro J, Álvarez E, García D, Orallo F. Resveratrol modulates rat macrophage functions. *Int. Immunopharmacol* 2002; 4:767-774.
- Leite MS, Pacheco P, Gomes RN, Guedes AT, Castro-faria-Neto HC, Bozza PT, Koatz VL. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock* 2005; 23(2):173-178.
- Leng L, Wang W, Roger T, Merk M, Wuttke M, Calandra T, Bucala R. Glucocorticoid-induced MIF expression by human CEM T cells. *Cytokine* 2009; 48(3):177-85.

- Lessmann V. Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen Pharmacol* 1998;31:667-674.
- Leung F.Y. Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. *J.Nutr.Biochem* 1998; 9:304-307.
- Levels J.H, Lemaire L.C, Van der Ende A.E, Van Deventer S.J, Van Lanschot J.J. Lipid composition and lipopolysaccharide binding capacity of lipoproteins in plasma and lymph of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure. *Crit. Care Med* 2003; 31: 1647-1653.
- Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I. and Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol* 2007; 7, 678-689.
- Li Y, Liu Z, Liu B, Zhao T, Chong W, Wang Y, Alam HB. Citrullinated histone H3: a novel target for the treatment of sepsis. *Surgery*. 2014; 156(2):229-34.
- Liang C, Rounds NK, Dong E, Stevens SY, Shite J & Qin F. Alterations by norepinephrine of cardiac sympathetic nerve terminal function and myocardial  $\beta$ -adrenergic receptor sensitivity in the ferret: normalization by antioxidant vitamins. *Circulation* 2000; 102, 96-103.
- Limón-Pacheco J1, Gonsébat ME. 47The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*. 2009;674(1-2):137
- Lin, K. T., Xue, J. Y., Nomen, M., Spur, B., Wong, P. Y. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells, *J.Biol.Chem* 1995; 270: 16487-16490.
- Linehan E, Dombrowski Y, Snoddy R, Fallon PG, Kissenpfennig A, Fitzgerald DC. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell*. 2014;13(4):699-708.
- Lipinski, B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2011; 809-6-96.
- Liu Shu-Zheng. On Radiation Hormesis Expressed in the Immune System. *Critical Reviews in Toxicology* 2003; 33(3&4):431-441.
- Lovesio, C. *Medicina Intensiva*. 5ª Edición. Buenos Aires. Editorial El Ateneo. 2001. 1163-1181 p.p.
- Luchtemberg MN, Petronilho F, Constantino L, Gelain DP, Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Streck EL, Dal-Pizzol F. Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. *Clin Biochem*. 2008;41(14-15):1186-90.
- Lucia Nikolaia López-Bojórquez,, Alejandro Zentella Dehesa, Gustavo Reyes-Terán. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Archives of Medical Research*. 2004; 35 (6):465-479.

Luderitz, O., Freudenberg, M., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. T., y Shaw, D. H. Membrane lipids of prokaryotes. Current topics in membranes and transport. Razin, S. y Rottem, S. Eds. (Academic Press Inc., New York) 1982; p. 79.

Lue H, Dewor M, Leng L, Bucala R, Bernhagen J. Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74. Cell Signal 2011; 23(1):135-44.

Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. Annu Rev Med 1996; 47:413-21.

Luscinskas FW, Leick M, Newton G, Nusrat A. Introduction for the special issue on "Tissue Barriers in Inflammation". Tissue Barriers 2015; 3(1-2).

M. Biburger, G. Tiegs,  $\alpha$ -galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF- $\alpha$  but independent of Kupffer cells, J. Immunol. 175 (2005) 1540–1550.

M.J. Loza, L.S. Metelitsa, B. Perussia, NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production, Eur. J. Immunol. 32 (2002) 3453–3462.

Ma T, Han L, Gao Y et al. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis. Eur Surg Res 2008; 41:219–225.

MacGarvey, N.C. et al. Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. Am. J. Respir. Crit. Care Med 2012; 185, 851–861

MacNeil BJ, Jansen AH, Janz LJ, Greenberg AH & Nance DM. Peripheral endotoxin increases splenic sympathetic nerve activity via central prostaglandin synthesis. Am J Physiol 1997; 273, 609–614.

Madonna R1, Jiang J, Geng YJ. Attenuated expression of gelsolin in association with induction of aquaporin-1 and nitric oxide synthase in dysfunctional hearts of aging mice exposed to endotoxin. Int J Immunopathol Pharmacol 2012; (4):911-22.

Maioli NA, Zarpelon AC, Mizokami SS, Calixto-Campos C, et al. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. Braz J Med Biol Res. 2015;48(4):321-31.

Majerus, T. C. Overview of shock, Arch.Int.Physiol Biochim 1984; 92: S1-S4 .

Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2002;9:401-410.

Makinodan T, Kay MMB. Age influence on the immune system. *Adv Immunol* 1980;29:287.

Malorni W, Rivabene R, Santini M, Donelli G. NAC inhibits apoptosis and decreases viral particles in HIV-chronically infected U937 cells. *FEBS let* 1993; 327:75-78.

Marie C, Cavaillon JM, Losser MR. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*. 1996;125:520-521.

Marik PE. Management of the critically ill geriatric patient. *Crit Care Med* 2006; 34: S176-S182 2

Mark T McAuley, Rose Anne Kenny, Thomas BL Kirkwood, Darren J Wilkinson, Janette JL Jones, and Veronica M Miller. A mathematical model of aging-related and cortisol induced hippocampal dysfunction *BMC Neurosci*. 2009; 10: 26.

Markus Bosmann and Peter A. Ward. The inflammatory response in Sepsis. *Cell Press*. 2013; vol 34:3.

Markus Bosmann and Peter A. Ward. The inflammatory response in sepsis. *Trends in Immunology* 2013; 34(3):129-136.

Marriott I, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res*. 2006;34(3):177-92.

Marriott I, Bost KL, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: a possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. *J Reprod Immunol*. 2006;71(1):12-27.

Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 2006; 34: 15-21 5.

Martin, C., Viviani, X., Leone, M., Thirion, X. Effect of norepinephrine on the outcome of septic shock, *Crit Care Med* 2000; 28: 2758-2765.

Martin, M., R. E. Schifferle, N. Cuesta, S. N. Vogel, J. Katz, and S. M. Michalek. Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J. Immunol* 2003;171: 717-725.

Masson I, Mathieu J, Nolland XB, De Sousa M, Chanaud B, Strzalko S, Chancerelle Y, Kergonou JF, Giroud JP, Florentin I. Role of nitric oxide in depressed lymphoproliferative responses and altered cytokine production following thermal injury in rats. *Cell Immunol*. 1998;186(2):121-32.

Mate I, Madrid JA, De la Fuente M. Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 4642-55.



Mate I. Caracterización de marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo en el envejecimiento humano y en un modelo de Alzheimer en ratón. UCM / Tesis 2015.

Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. J Pharmacol Sci. 2006;101:189-198.

Matthay, M.A. et al. The acute respiratory distress syndrome. J. Clin. Invest. 2012; 122, 2731–2740.

Mattson Mark P. Hormesis defined. Ageing Research Reviews 2008; 7:1-7.

Mattson MP, Duan W, Wan R, Guo Z. Prophylactic activation of neuroprotective stress response pathways by dietary and behavioral manipulations. NeuroRx 2004a;1:111–116.

Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: A dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci 2004b;27:589 -594.

Mattson MP. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. Brain Res 1988;472:179–212.

Mayer Sagy, MD., Yasir Al-Qaqaa, MD., and Paul Kim, MD. Definitions and Patholophysiology of sepsis. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2013; 43:260-263.

Mayer, H., Bhat, U. R., Masoud, H., Radziejewska-Lebrecht, J., Widemann, C. and Krauss, J. H. Bacterial lipopolysaccharides. Pure & Appl. Chem. 1989; 61:1271-1282.

Mayer, H., Tharanathan, R. N. and Weckesser, J. Analysis of lipopolysaccharides of Gramnegative bacteria. FEMS Microbiol. 1985; 18:157-207.

McCord J.M. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. Clin.Biochem 1993;26:351-367.

McCord, J. M. y Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), J.Biol.Chem 1969; 244: 6049-6055 .

McCourt M, Wang J, Sookhai S and Redmond H. Activated human neutrophils release hepatocyte growth factor/scatter factor. European Jour of Surg Onco 2001; 27:396-403.

McFarland RA. Human factors in air transportation: occupational health and safety. New York: McGraw-Hil; 1953.

McLaughlin K.A, Osborne B.A, Goldsby R.A. The role of oxygen in thymocyte apoptosis. Eur J Immunol 1996; 26:1170-1174.

- Meister, A. and Anderson, M. E. Glutathione, *Annu.Rev.Biochem* 1983; 52: 711-760.
- Mesquita A, Weinberger M, Silva A, Sampaio-Marques B, Almeida B, Leão C, Costa V, Rodrigues F, Burhans WC, Ludovico P. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide dismutase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(34):15123-8.
- Michelle Ramírez, MD. Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2013; 43: 273-277.
- Milam KE, Parikh SM. The angiopoietin-Tie2 signaling axis in the vascular leakage of systemic inflammation. *Tissue Barriers* 2015 ;3(1-2).
- Miller RA. Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine* 2000;18: 1654-60.
- Miller, R. A. The biology of aging and longevity. En Hazzard, W.R. (ed.), *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology* (pp. 3-18). New York: McGraw-Hill 1994.
- Mills, G. C. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *J.Biol.Chem* 1957; 229: 189 .
- Miquel J, Blasco M. A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol* 1978; 13: 389-396.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575-91.
- Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr. A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging. En: Johnson JE Jr (Ed): *Aging and Cell Structure*, vol 2. Nueva York: Plenum Press; 1984; p. 247-380.
- Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998; 33: 113-26.
- Miquel J. Integration of theories of ageing (Part I). *Revista Española de Geriatria y Gerontología* 2006; 41(1):55-63.
- Miquel J. Integration of theories of ageing (part II). *Revista Española de Geriatria y Gerontología* 2006a; 41(2):125-127.
- Miquel, J. and Fleming, J. Theoretical and experimental support for an 'oxygen radical-mitochondrial injury' hypothesis of cell aging. In Johnson, J.E., Walford, R., Harman, D. and Miquel, J. (eds), *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases*. Alan R. Liss Inc., New York 1986; pp. 51-74
- Miquel, J., and M. Blasco. A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp. Gerontol*. 1978; 13:389-396.

Mishara B.L, Riedel R.G. El proceso de envejecimiento. Le Vieillessement/Presses Universitaires de France, Edit Morata; 2000.

Mishra V. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. Clin Lab 2007; 53: 199-09.

Miura T, Muroaka S, Ikeda N, Watsanabe M, Fujimoto Y. Antioxidative and prooxidative action of stillbene derivates. Pharmacol. Toxicol 2000; 86:203-208.

Monaghan P1, Haussmann MF. The positive and negative consequences of stressors during early life. Early Hum Dev. 2015;91(11):643-7.

Moore, S.F. and MacKenzie, A.B. (2009) NADPH oxidase NOX2 mediates rapid cellular oxidation following ATP stimulation of endotoxin-primed macrophages. J. Immunol. 183, 3302–3308.

Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Larrea C. Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. Curr Genomics 2012 Dec; 13(8):589-602.

Morrison DC, Ultevich JL. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems: a review. American Journal of Pathology 1978; 93:526-617.

Morrison, D. C. Handbook of Endotoxin. Berry, L. J. Eds. (Elsevier Science Publishers, New York) 1985; pp. 25-55.

Morrison, D. C. y Oades, Z. G. Mechanisms of lipopolysaccharide-initiated rabbit platelet responses. II. Evidence that lipid A is responsible for binding of lipopolysaccharide to the platelet, J.Immunol 1979; 122: 753-758 .

Muhlfelder TW, Niemetz J, Kreutzer D, et al. C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. J. Clin. Invest 1979; 63: 147-150.

Muller B, Aparin PG, Stoclet JC, Kleschyov AL. Glycyrrhetic acid reverses the lipopolysaccharide-induced hypocontractility to noradrenaline in rat aorta: implications to septic shock. J Pharmacol Sci. 2014;125(4):422-5.

Muller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. Ann. Rev. Biochem 1988; 57: 321–347.

Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:316-321.

Murphy, M. E. y Sies, H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1991, 88: 10860-10864 .

Murugaiyah V, Mattson MP. Neurohormetic phytochemicals: An evolutionary-bioenergetic perspective. *Neurochem Int.* 2015; pii: S0197-0186(15)00060-1.

Naciones Unidas. Informe del secretario general. Seguimiento de la segunda asamblea mundial sobre el envejecimiento. Ginebra: ONU 2010.

Nakagami Y, Kawashima K, Etori M, Yonekubo K, Suzuki C, Jojima T, Kuribayashi T, Nara F, Yamashita M. A novel CC chemokine receptor 4 antagonist RS-1269 inhibits ovalbumin-induced ear swelling and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107(4):793-7.

Nasa P, Juneja D, Singh O, Dang R, Arora V. Severe Sepsis and its Impact on Outcome in Elderly and Very Elderly Patients Admitted in Intensive Care Unit. *J Intensive Care Med* 2011; Epub ahead of print

Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1994;120:771-783.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420:846-852.

Naudí A, Jové M, E Llieva, D. Cacabelos, H. Gonzalo, J. Serrano, J. Boada, M.V. Ayala, M. Portero- Otín, R. Pamplona. Oxidación de macromoléculas, envejecimiento y longevidad. *Biogerontología médica* 2009; p43-69.

Navarro A, SÁCHÉZ - Pino M.J, Gómez C, González M, Báñez M, Boveris A.D, Boveris A. Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance and brain mitochondrial function in aging in male mice. *Am J.Physiol.Regul.Integr.Comp Physiol.* 2005; 289:1392-1399.

Navarro A, SÁCHÉZ Del Pino M.J, Gómez C, Peralta J.L, Boveris A. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J.Physiol.Regul.Integr.Comp Physiol.* 2002; 282:985-992.

Nelson, D. W., Brown, J. M., Banerjee, A., Bensard, D. D., Rogers, K. B., Locke-Winter, C. R., Anderson, B. O., Harken, A. H. Pretreatment with a nontoxic derivative of endotoxin induces functional protection against cardiac ischemia/reperfusion injury, *Surgery* 1991;110: 365-369.

Neumann NF, Belosevic M. Deactivation of primed respiratory burst response of gold fish macrophages by leukocytederived macrophage activating factor(s). *Developmental and Comparative Immunology* 1996;20:427-39.

Nielsen E.R, Eskildsen-Helmond Y, Rattan S.I.S. MAP-kinases and heat shock-induced hormesis in human fibroblasts during serial passaging in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1067:343-348.

- Niki, E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation, *Chem.Phys.Lipids* 1987;44: 227-253.
- Nordberg J, Amér E.S.J. Reactive species oxygen, antioxidants and mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:1287-1312.
- Novotny AR, Reim D, Assfalg V, Altmayr F, Friess HM, Emmanuel K, Holzmann B. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology*. 2012 Jun; 217(6):616-21.
- Nowosielska E, J. Wrembel-Wargocka, A. Cheda, E. Lisiak, M.K. Janiak, Enhanced cytotoxic activity of macrophages and suppressed tumor metastases in mice irradiated with low doses of X-rays, *J. Radiat. Res.* 2006; 47:1-8.
- Núñez C, Nishimoto N, Gartland GL, Billips LG, Burrows PD, Kubagawa H, Cooper MD. B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol* 1996; 156:866-72.
- Nystrom PO. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41 Suppl A:1-7.
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 353-364.
- Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001; 16:83-96.
- Olsen A, Vantipalli M.C, Lithgow G.J. Lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* following repeated mild hormetic heat treatments. *Biogerontology* 2006; 7:221-230.
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:353-364.
- Onikawa I, Novikoff P.M. Catalase-negative peroxisomes. Transient appearance in rat hepatocytes during liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Pathol* 1995; 146:673-687.
- Opal SM, Cross AS. Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13:285-297, vii
- Opal SM, Girard TD, Ely EW. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 7: S504-S512 22
- Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med.* 2015;277(3):277-93.
- Opal, S. Huber, CH. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock: *Critical Care* 2002; Vol 6. N° 2:125-136 p.p.

- Organización Mundial de la Salud . Envejecimiento activo. Geneva: OMS 2002.
- Organización Mundial de la Salud. Clasificación Internacional del Funcionamiento, de la Discapacidad y de la Salud (CIF). Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales 2001.
- Organización Mundial de la Salud. Envejecimiento activo: un marco político. Rev Esp Geriatr Gerontol 2002; 37(supl 2):74-105.
- Ortega E, Giraldo E, Hinchado MD, Martín L, García JJ, De la Fuente M. Neuroimmunomodulation during exercise: role of catecholamines as 'stress mediator' and/or 'danger signal' for the innate immune response. Neuroimmunomodulation. 2007;14(3-4):206-12.
- Ortiz Leyba C, J. Garnacho Montero Conocimientos actuales en la fisiopatología de la sepsis Current knowledge in sepsis physiopathology Med Intensiva 2005;29:135-41 - Vol. 29 Núm.3
- Osato J.A, Korkina L.G, Santiago L.A, Afanás eva I,B. Effects of bionormalizer (a food supplementation) on free radical production by humans neutrophils, erythrocytes, and rat peritoneal macrophages. Nutrition 1995;11:568-572.
- Osato J.A, Korkina L.G, Santiago L.A, Afanás eva I,B. Effects of bionormalizer ( a food supplementation) on free radical production by humans neutrophils, erythrocytes, and rat peritoneal macrophages 1995, Nutrition 11:568-572.
- Otto CM, Drobatz KJ, Soter C. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. J Vet Intern Med 1997;11:65-70.
- Ousman SS, David S. MIP-1alpha, MCP-1, GM-CSF, and TNF-alpha control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. J Neurosci. 2001 Jul 1;21(13):4649-56.
- P Swain, S. K, Nayak, P.K, Nanda S. Dash. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. Fish & Shellfish Immunology. 2008 (25):191-201.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 1999; 18: 6853- 6866.
- Palacios R., Sugawara I. «Hydrocortisone abrogates proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 Producer T cells unresponsive to interleukin-1 and unable to synthesize the T-cell growth factor». Scand J Immunol 1982; 15 (1): 25-31.
- Palencia. Herrejón E. La sepsis: definiciones y estadios. REMI 2004; 4 (6): C1.

Palma P, Rinaldi S, Cotugno N, Santilli V, Pahwa S, Rossi P, Cagigi A. Premature B-cell senescence as a consequence of chronic immune activation. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(7):2083-8.

Palva, E. T. and Mákelá, P. H. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Salmonella typhimurium* analyzed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 1980; 107:137-143.

Pandey P, B.S. Shankar, D. Sharma, K.B. Sainis, Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8+T cells, *Int. T. Radiat. Biol.* 2005; 81: 801–812.

Pardo G. A. Consideraciones generales sobre algunas de las teorías del envejecimiento. *Rev Cub Invest Biomed* 2003; 22(1):58-67.

Parratt JR. Nitric oxide: a key mediator in sepsis and endotoxemia? *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 493–506.

Pawelec G. Hallmarks of human “immunosenescence”: adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 2012; 9:15.

Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2001 Nov-Dec;22(6):873-83.

Pfeiffer R. Untersuchungen uber das Choleragift. *Z Hyg* 1892;11:393-411.120.

Pierrakos, C. et al. Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options. *J. Clin. Med. Res.* 2012; 4, 7–16.

Pisochi AM, Pop A. The role antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015; 5(97):55-74.

Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., and Sambhara, S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 2004; 3, 161–167.

Pomaki M, Mota J, De la Fuente M and Berger J. Effects of thiolic antioxidants on in vitro mouse peritoneal macrophage functions. *Comp Clin Path* 2005; 13:176-181.

Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology* 2004; 113, 348–354.

Population Division, Department of Economic and Social Affairs. World Population Ageing: 1950-2050. 2001. Available from: URL: <http://www.un.org/esa/population/publications/worldageing19502050>.

Portoles, M. T., Ainaga, M. J., Pagani, R. The induction of lipid peroxidation by *E. coli* lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage, *Biochim.Biophys.Acta* 1993;1158: 287-292 .

Prashant Nasa, Deven Juneja, Omeder Singh. Severe shock and septic shock in the elderly: An overview. *World J Crit Med* 2012; 4:1(1):23-30.

Pryor W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions. *Annu. Rev. Physiol* 1986; 48: 657-667.

Puerto M, Guayerbas N, Víctor V, De la Fuente M., 2002 Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73(4):797-804 .

Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 797-804..

Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ: Cd14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994;1:509-516.

Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.

Raetz, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. *Ann. Rev. Biochem.* 1990, S9: 129-170.

Ramer-Quinn DS, Baker RA, Sanders VM. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J Immunol* 1997;159:4857-4867.

Ratia M, Giménez-Llort L, Camps P, Muñoz-Torrero D, Clos MV, Badia A. Behavioural effects and regulation of PKC $\alpha$  and MAPK by huprine X in middle aged mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;95(4):485-93.

Rattan I.S.I. Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 2004b; 59A: 705-709.

Rattan I.S.I. and Dino Demirovic. Hormesis can and does work in humans. *International Dose Response Society* 2010; 8:58-63.

Rattan I.S.I. Anti-ageing strategies: prevention or therapy?. *EMBO Reports* 2005; Volumen 6: s25-s29.

Rattan I.S.I. Hormesis in biogerontology. *Crit. Rev. Toxicol* 2001; 20:281-285.

Rattan S.I.S and Ali R.E. Homeostasis, homeodynamics, and aging. In: *Encyclopedia of Gerontology*. Elsevier Inc. Birren J.UK. 2007; Pp.696-699.

Rattan S.I.S. Hormesis in aging. *Ageing Research Reviews* 2008; 2: 63-78.

Rattan SI. Hormetic modulation of aging and longevity by mild heat stress. *Dose Response* 2006; 3(4):533-46.



Rattan, S.I.S. Repeated mild heat shock delays ageing in cultured human skin fibroblasts. *Biochem. Mol. Int.* 1998; 45:753-759.

Ravin, H. A., Rowley, D., Jenkins, C., Fine, J. On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal, *J.Exp.Med* 1990; 112: 789-90 .

Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, Milam JE, Newstead MW, Standiford TJ. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Blood* 2008; 112(10):4250-8.

Regel G, Nerlich M. L, Dwenger A, Seidel J, Schmidt C, Sturm, J. A. Phagocytic function of polymorphonuclear leukocytes and the RES in endotoxemia. *J. Surg. Res* 1987; 42, 74-84.

Reid KB, Porter RR. The proteolytic activation systems of complement. *Ann. Rev. Biochem* 1981; 50: 433-464.

Ren H, Jiwei Shen a,b, Chikako Tomiyama-Miyaji a,c, Mayumi Watanabe a, Eisuke Kainuma a, Masashi Inoue a, Yuh Kuwano a, Toru Abo a. Augmentation of innate immunity by low-dose irradiation *Cellular Immunology* 2006; 244: 50-56.

Richard S. Hotchkiss M.D and Karl, I. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med* 2003; 348:138-150.

Richter, C. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and respiration, *Biosci.Rep* 1997; 17: 53-66.

Rick, P. D. Lipopolysaccharide biosynthesis. En *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, F. C. Neidhardt (Ed.). Washington, DC: ASM Publications. 1987; p. 648-662.

Rico A. Chemo-defence system. *C R Acad Sci III.* 2001;324(2):97-106.

Ridley AJ, Allen WE, Peppelenbosch M, Jones GE. Rho family proteins and cell migration. *Biochem Soc Symp* 1999;65:111-23.

Riedemann NC, Guo RF, Gao H, et al. Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J. Immunol* 2004; 173: 1355-1359.

Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003; 9: 517-524.

Riedemann, N.C. et al. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J* 2004; 18, 370-372

Rietschel, E. T. and H. Brade. Bacterial Endotoxins. *Sci. Am.* 1992; 267:26-33.

Rietschel, E. T., Brade, L., Brandenburg, K., Flad, H. D., Jong-Leuveninck, J., Kawahara, K., Lindner, B., Loppnow, H., Luderitz, T., Schade, U. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A, *Rev.Infect.Dis.* 1987; 9 Suppl 5: S527-S536 .

Rietschel, E. T., Schade, U., Jensen, M., Wollenweber, H. W., Luderitz, O., Greisman, S. G. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia, *Scand.J.Infect.Dis.Suppl* 1982; 31: 8-21 .

Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response* 2014; 12(2):288-341.

Rittirsch D, et al. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med* 2008; 14: 551-557.

Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR et al. Functional role for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med* 2008; 14(5): 551-557.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol* 2008; 8: 776-787.

Rivera-Pastrana DM, Gardea AA, Yahia EM, Martínez-Téllez MA, González-Aguilar GA2.Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. *J Food Sci Technol.* 2014;51(12):3821-9.

Robinson J.M; Badwey J.A. Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. *Immunology* 1994; 60:159-178.

Rodney L.Levine, Earls R.Stadtman. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology* 2000; 36: 1495-1502.

Rossi MI, Yokota T, Medina KL, Garrett KP, Comp PC, Schipul AH Jr., Kincade PW. B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood* 2003; 101:576-84.

Rozenberg S, Besse S, Brisson H, Jozefowicz E, Kandoussi A, Mebazaa A, Riou B, Vallet B, Tavernier B. Endotoxininduced myocardial dysfunction in senescent rats. *Crit Care* 2006; 10: R124 32.

Saha DC, Astiz ME, Eales-Reynolds LJ, Rackow EC. Lipopolysaccharide- and superantigen-modulated superoxide production and monocyte hyporesponsiveness to activating stimuli in sepsis. *Shock.* 2012;38(1):43-8.

Saito H, Papaconstantinou J. Age-associated differences in cardiovascular inflammatory gene induction during endotoxic stress. *J Biol Chem* 2001; 276: 29307-29312 31

Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev* 2003; 124(10-12):1047-58.

Salicru AN, Sams CF, Marshall GD. Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Brain Behav Immun*. 2007;21:913-920.

Samson, L., Cairns, J. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* 1977; 267, 281–283.

Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Pedersen AN, Skinhøj P, Pedersen BK. Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 107-114 29

Saran, M. y Bors, W. Radical reactions in vivo--an overview, *Radiat. Environ. Biophys* 1990; 29: 249-262 .

Sarmiento A, Marques F, Anthony E, Ellis AE, Afonso A. Modulation of the activity of seabass (*Dicentrarchus labrax*) headkidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology* 2004;16:79-92.

Sastre J, Pallardó F.V, Viña J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35:1-8.

Sauler M, Bucala R, Lee PJ. Role of macrophage migration inhibitory factor in age-related lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;309(1):L1-L10.

Sauvé S1, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Sénécal L, Goudreau P, Fournier M. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat Toxicol*. 2002;58(3-4):189-200.

Schiffman E. Leukocyte chemotaxis. *Annu Rev Physiol* 1982;44:553-568. 6.

Schmittinger CA, Wurzinger B, Deutinger M, Wohlmuth C, Knotzer H, Torgersen C, D'unsen MW & Hasibeder WR. How to protect the heart in septic shock: a hypothesis on the pathophysiology and treatment of septic heart failure. *Med Hypotheses* 2009; 74, 460.

Schubert M.P. Compounds of thiol acids with aldehydes. *J Biol Chem* 1936; 114:341-350.

Schumacher WA, Fantone JC, Kunkel SE, Webb RC, Lucchesi BR. The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo. *Agents Actions*. 1991; 34: 345–349.

Scumpia PO1, McAuliffe PF, O'Malley KA, Ungaro R, Uchida T, Matsumoto T, Remick DG, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL, Efron P. CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2005; 175(5):3282-6.

Scumpia, P.O. et al. CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 2005; 175, 3282–3286

Selig C, Nothdurft W. Cytokines and progenitor cells of granulocytopoiesis in peripheral blood of patients with bacterial infections. *Infect Immun* 1995; 63:104-109.

Sener G, Toklu H, Kapucu C, et al. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* 2005;35: 52-9.

Serafim KG1, Navarro SA, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, et al. Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015.

Seydel, U., Brandenburg, K., Koch, M. H., Rietschel, E. T. Supramolecular structure of lipopolysaccharide and free lipid A under physiological conditions as determined by synchrotron small-angle X-ray diffraction, *Eur.J.Biochem* 1989; 186: 325-332 .

Seydel, U., Schromm, A. B., Blunck, R., Brandenburg, K. Chemical structure, molecular conformation, and bioactivity of endotoxins, *Chem.Immunol* 2000; 74: 5-24 .

Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D et al. Science review: the brain in sepsis—culprit and victim. *Crit Care* 2005;9:37–44.

Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2010;22(4):507-13.

Sherwood, E. Current Concepts of the Inflammatory Response: The American Society of Anesthesiologist. 2002; Vol 30. Chapter 14. 168-185 p.p.

Shi X, Zhang LJ, Bai HY, Bao CM, Hu S, Guan L.[Effects of electroacupuncture on hepatic blood flow and lipid peroxidation in septic rats]. *Zhongguo Zhen Jiu.* 2010;30(5):397-400.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-1782.

Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sonobe T, Kamiya A, Shishido T, Tokudome T, Hosoda H, Shirai M, Kangawa K & Sugimachi M. Centrally administered ghrelin activates cardiac vagal nerve in anesthetized rabbits. *Auton Neurosci* 2011; 162, 60–65

Shinkai S, Konishi M, Shephard RJ. Aging and immune response to exercise. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76:562-72.

Shock NW. Physiological and chronological age. En: *Aging its chemistry*. (Dietz AA). The American Association for Clinical Chemistry 1979.

Shu Fang Liu and Asrar B. Malik NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L622-L645.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 2015; 4:180-3.

Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenscher*. 1991; 69:965-968.

Simms H. H, D'Amico R, Burchard K. Untreated intraabdominal sepsis: Lack of synergism between polymorphonuclear leukocyte (PMN) complement receptors CR1/CR3 and IgG receptor FcRIII. *J. Trauma* 1990; 30: 1027-1031.

Sirgo G, Claramonte R, Chánovas M, Esteban F, Forcadell I, Luna J, Masdeu G, Ramón Vázquez J, Artigas A. Dendritic cells in sepsis: an approach to post-infectious immunosuppression. *Med Intensiva* 2010; 34(8):559-66.

Sirgo, G. Dendritic cells in sepsis: an approach to postinfectious immunosuppression. *Med. Intensiva* 2010; 34, 559-566 (in Spanish)

Smialowicz RJ1, Riddle MM, Williams WC, Copeland CB, Luebke RW, Andrews DL. Smithies, M. Weaver, C. Role of the tissue factor pathway in the pathogenesis and management of multiple organ failure. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2004; Vol 15. (Suppl 1). S11-S20 p.p.

Snyderman R, Goetzl EJ. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 1981;213(4510):830-837.

Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity* 2006; 24(5):491-4.

Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol* 2012;24(5):331-41.

Southorn P. A. and Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc* 1988; 63: 381-389.

Spite M, Norling LV, Summers L et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 2009; 461:1287-91.

- Spitzer J. A, Zhang P, Mayer A. M. S. Functional characterization of peripheral circulating and liver recruited neutrophils in endotoxic rats. *J. Leukoc. Biol* 1994; 56, 166–173.
- Sriskandan S, Altmann D M. The immunology of sepsis. *J Pathol* 2008; 214 (2): 211-23.
- Stadman E.R and Berlett B.S. Reactive-oxygen mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol* 1997; 10:485-494.
- Stadman E.R and Levine R.L. Protein oxidation. *Ann. NY.Acad.Sci.* 2000; 899:191-208.
- Stebbing A.R.D. Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment* 1982; 22 (3):213–234.
- Stojanovich, L. et al. Cardiovascular autonomic dysfunction in systemic lupus, rheumatoid arthritis, primary Sjogren syndrome and other autoimmune diseases. *Lupus* 2007; 16, 181–18.
- Stout RD and Suttles J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation by age-associated microenviromental changes. *Immunolo Rev* 2005; 205:60-71.
- Strain, S. M., Fesik, S. W., and Armitage, I. M. Characterization of lipopolysaccharide from a heptoseless mutant of *Escherichia coli* by carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:2906-2910.
- Streckert A, Alves de Castro A, Quevedo J and Dal Pizzol F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N.acetylcysteine, vitamins and statins. *Current Neuros Resear* 2014; 11:83-98.
- Strehler BL. Time, cells and aging. New York: Academic Press 1977.
- Su D, Roth RI, Levin J. Hemoglobin infusion augments the tumor necrosis factor response to lipopolysaccharide. Existence of an interspecies cross-reactive idiootype associated with anti-lipid A antibodies. *The Journal of Immunology.* 1990; 145:2994-3001.
- Subhashini N, Thangathirupathi A, Lavanya N. Antioxidant Activities of *Trigonella Foenum Graecum* using various in-vitro and ex-vivo models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2011;0975-1491.
- T. Finkel, Nikki J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408 239 247.
- T. J. Schulz, K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer, M. Ristow, Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Lifespan by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metabolism* 2007; 6 280 293 .

Tapia PC. "Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality". Med. Hypotheses 66 2006; (4): 832-43.

Tapiero H, Townsend D.M, Tew K.D. The antioxidant role of Selenium and seleno-compounds. Biomed Pharmacother 2003; 57:134-144.

Tapping R.I., and Tobias P.S. Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide. Chem. Immunol 2000; 74:108-121.

Taro Kawai and Shizuo Akira. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. Immunity 2011; 34: 637-650.

Territo M. C, Golde D. W. Granulocyte function in experimental human endotoxemia. Blood 1976; 47, 539-544.

Thiault N, Darrigues J, Adoue V, Gros M, Binet B, Peral C, Leobon B, Fazilleau N, Joffre OP, Robey EA, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. Nat Immunol 2015; 16(6):628-34.

Thiruma V. Arumugan, Marc Gleichman, Sung-Chun Tang, Mark P. Mattson. Hormesis/preconditioning mechanisms, the nervous system and aging. Ageing Research Reviews 2006; 5:165-178

Thomas L. Germs. N Engl J Med. 1972;287(11):553-5.

Thurman JM. Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human diseases. J. Immunol 2006;176: 1305-1310.

Tietze, F., Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Anal. Biochem. 1969, 17:502-522.

Toklu HZ, Tunali Akbay T, et al. Silymarin, the antioxidant component of Silybum marianum, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. J Surg Res 2008; 145(2): 214-22.

Traber, D. L. Animal models: the sheep, Crit Care Med 2000; 28: 591-592.

Tröen BR. The Biology of aging. The Mount Sinai Journal of Medicine 2003; 70:3-22.

Tyler, D. D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver, Biochem.J. 147: 493-504 .

Tymml K, Li F, Wilson JX. Septic impairment of capillary flow requires NAD(P)H oxidase but not NOS and is rapidly reversed by ascorbate through an eNOS-dependent mechanism. *Crit Care Med* 2008; 36 (8): 2355-2362.

Umberger R, Callen B, Brown ML. Severe sepsis in older adults. *Crit Care Nurs Q* 2015; 38(3):259-70.

V.M Víctor, N. Guayerbas; D. garrote; M. Del Río and M. De la Fuente. Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *BioFactors* 1999; 10:347-357.

Vaiserman A.M, Koshel N.M, Litoshenko A.Y, Mozzhukhina T.G, Voitenko V.P. Effects of X-irradiation in early ontogenesis on the longevity and amount of the S1 nuclease-sensitive DNA sites in adult *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 2003; 4:9-14.

Vaiserman Alexander M. Hormesis, adaptive epigenetic reorganization, and implications for human health and longevity. *International Dose Response Society* 2010; 8:16-21.

Valenti WM, Trudell RG, Bentley DW. Factors predisposing to oropharyngeal colonization with gram-negative bacilli in the aged. *N Engl J Med* 1978; 298: 1108-1111 20

Valko, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2007; 39, 44–84.

Van Amersfoort E., Van Berkel T., and Kuiper, J. Receptors, Mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16: 379-414.

Van Berlo, D. et al. Neutrophil-derived ROS contribute to oxidative DNA damage induction by quartz particles. *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 49, 1685–1693.

Van der Poll T, Levi M, Nick JA, Abraham E. Activated protein C inhibits local coagulation after intrapulmonary delivery of endotoxin in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1125-1128.

Vanhaesebroeck B, Jones GE, Allen WE, Zicha D, Hooshmand-Rad R, Sawyer C, Wells C, Waterfield MD, Ridley AJ. Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat Cell Biol* 1999;1(1):69-71.

Vaynman S, Ying Z, Gomez Pinilla, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci* 2004; 20:2580-2590.



Verbeke P, Clark B.F.C, Rattan S.I.S. Reduced levels of oxidized proteins in human fibroblasts exposed to repeated mild heat shock during serial passaging in vitro. *Free. Radic. Biol. Med.* 2001; 31:1593-1602.

Victor M Victor, Milagros Rocha, Mónica De la Fuente. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International Immunopharmacology* 2004; 4:327-247.

Víctor M. Victor; Milagros Rocha; Juan. V. Esplunges and Mónica De la Fuente. Role of Free Radicals in Sepsis: Antioxidant therapy. *Current Pharmac Desig* 2005; 11:3141-3158.

Víctor V. M. Estudio comparado de la función inmune en modelos murinos de shock endotóxico. Papel de los antioxidantes. UCM 2001. Tesis Doctoral.

Víctor VM, De La Fuente M. Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related to the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Physiol Res* 2003;52(1):101-10.

Víctor VM, De la Fuente M. Comparative study of peritoneal macrophage functions in mice receiving lethal and non-lethal doses of LPS. *J Endotoxin Res* 2000; 6(3):235-241.

Víctor VM, De la Fuente M. N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res* 2002; 36(1):33-45.

Víctor VM, De la Fuente M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress. Involvement of NF-kappa $\beta$ . *Free Radic Res* 2003; 37:19-27.

Víctor VM, Guayerbas N, Puerto M, Medina S, De la Fuente M: Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock. *Immunopharmacol* 2000; 46: 89–101, 2000.

Víctor VM, Miñano M, Guayerbas N, Del Río M, Medina S, De la Fuente M. Effects of endotoxic shock in several functions of murine peritoneal macrophages. *Mol Cell Biochem* 1998;189(1-2):25-31.

Víctor VM, Rubio D, de la Fuente M. Comparative study of several lymphocyte functions in two strains of mice with different models of endotoxic shock. *Physiol Res* 2002;51(3):291-8.

Vida C, Corpas I, De la Fuente M, González EM. Age-related changes in xanthine oxidase activity and lipid peroxidation, as well as in the correlation between both parameters, in plasma and several organs from female mice. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 551-8.

Vida C, González EM, De la Fuente M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 4656-78.

Villar J, Maca-Meyer N, Perez-Mendez L, Flores C. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care*. 2004;8:180-189.

Viña J, Gambini J, García-García FJ, Rodríguez-Mañas L, Borrás C. Role of oestrogens on oxidative stress and inflammation in ageing. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2013;16(2):65-72.

Viña J. Glutathione: metabolism and physiological functions. CRC press Boca Ratón Florida 1990.

Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, De la Fuente M. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol*. 2001;114(1-2):80-8.

Volk HD, Reinke P, Docke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol*. 2000;74:162-177.

Volk HD, Reinke P, Krausch D, et al. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med*. 1996; 22 Suppl 4:S474-481.

Von Dessauer B, Bongain J, Molina V, Quilodrán J, Castillo R, Rodrigo R. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. *J Crit Care* 2011; 26 (1): 103.e1-7.

Von Dessauer, B. et al. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. *J. Crit. Care* 2011; 26, 103.e101–103.e107.

Walford RL, Jawaideh SQ, Naeim F. Evidence for in vitro senescence of T-lymphocytes cultured from normal human peripheral blood. *Age* 1981;4:67-70.

Walford RL. Immunologic aspects of aging. *Klin Wochenschr* 1969, 47:599-605.

Walling, C. Oxidases and related redox systems. King, T. E. y Mason, M. Eds. (Pergamon Press,) 1982; pp. 85-97.

Wang JF, Li JB, Zhao YJ, Yi WJ, Bian JJ, Wan XJ, Zhu KM, Deng XM. Up-regulation of programmed cell death 1 ligand 1 on neutrophils may be involved in sepsis-induced immunosuppression: an animal study and a prospective case-control study. *Anesthesiology* 2015 Apr;122(4):852-63.

Wang T, Zhang X, Li J. The role NF- $\kappa$ B in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* 2002; 2(11):1509-1520.

Wang ZQ, Bapat AS, Rayanade RJ, Dagtas AS, Hoffmann MK. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (Fc $\gamma$ RIII) whose engagement

blocks the cell death programme and facilitates differentiation. Immunology. 2001;102(3):331-7.

Ward PA. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. J Innate Immun 2010;2(5):439-45.

Watson DW, Kim YB. Modification of Host Responses to Bacterial Endotoxins. I. Specificity of Pyrogenic Tolerance and the Role of Hypersensitivity in Pyrogenicity, Lethality, and Skin Reactivity. J Exp Med 1963;118:425-446.

Weber SU, Schewe JC, Lehmann LE et al. Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. Crit Care 2008;12:R128.

Webster N. R. and Nunn J. P. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. Br. J. Anaesth 1988; 60: 98-108.

Weinstein SL, Finn AJ, Dave SH, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta. J Leukoc Biol 2000;67:405-414.

Weisiger, R. A. y Fridovich, I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization, J.Biol.Chem. 1973, 248: 4793-4796 .

Weismüller K, Bauer M, Hofer S et al. The neuroendocrine axis and the pathophysiology of sepsis. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2010; 45:574–578.

Weksler ME. Changes in B cell respertorie with age. Vacine 2000; 18:1624-28.

Wenisch C, Parschalk B, Patruta S, Brustbauer R, Graninger W. Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gramnegative septicemia. Infection 1999; 27:183-186.

West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. Crit Care Med. 2002;30:S64-S73.

Westphal, O. An old-timer's reflections on endotoxin, en Bacterial endotoxin recognition and effector mechanisms, Levin, J., Alving, C. R., Munford, R. S., Stutz, P., Eds. (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam) 1993.

Westphal, O., Luderitz, O., Bister, F. (1952) Extraction of bacteria with phenol/water, Naturforsch. 7b: 148-155 .

Wolff A. Über Grundgesetze der Immunitat. Zentralbl Bakteriол. 1904 ;37:390-397.

Wong SC, Puaux AL, Chittezhath M, Shalova I, Kajiji TS, Wang X, Abastado JP, Lam KP, Biswas SK. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. Eur. J. Immunol 2010; 40, 2296–2307.

- Wright, S.D. Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249, 1431–1433.
- Wu R, Dong W, Zhou M, Zhang F, Marini CP, Ravikumar TS & Wang P (2007a). Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2007a;176, 805–813.
- Wu R, Zhou M, Das P, Dong W, Ji Y, Yang D, Miksa M, Zhang F, Ravikumar TS & Wang P. Ghrelin inhibits sympathetic nervous activity in sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007b; 293, E1697–E1702.
- Yamacita-Borin FY, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, et al.. Superoxide anion-induced pain and inflammation depends on TNF $\alpha$ /TNFR1 signaling in mice. *Neurosci Lett*. 2015;605:53-58.
- Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, et al. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis: increased responses of activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am J Pathol* 2002; 161:1805–14.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640-643.
- Yanase S, Ishii N. Hyperoxia exposure induced hormesis decreases mitochondrial superoxide radical levels via Ins/IGF-1 signaling pathway in a long-lived age-1 mutant of *Caenorhabditis elegans*. *J Radiat Res*. 2008;49(3):211-8.
- Yang W, Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*. 2010;8(12).
- Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S. Reactive oxygen species in the immune system. *Int Rev Immunol* 2013;32(3):249-70.
- Yeager ME, Belchenko DD, Nguyen CM. Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 46:14–22.
- Yong-Ming Yao, Ying-Yi Luan, Qing-Hong Zhang, Zhi-Yong Sheng. Pathophysiological Aspects of Sepsis: An Overview Sepsis Methods in Molecular Biology Volume 2015;1237: 5-15.
- Young JS, Monaghan SF, Chung CS, Cioffi WG, Ayala A, Heffernan DS. Divergent invariant natural killer T-cell response to sepsis of abdominal vs. non-abdominal origin in human beings. *Surg Infect (Larchmt)* 2015;16(1):29-35.
- Zakkar, M. et al. Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2009; 29, 1851–1857.

Zhang H,Wang HY, Bassel-Duby R, Maass DL, Johnston WE, Horton JW & Tao W. Role of interleukin-6 in cardiac inflammation and dysfunction after burn complicated by sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292, 2408– 2416.

Zhang J, Liu SS.Time-dependent stimulations of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride on redox reactants and antioxidases in *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67. *J Hazard Mater.* 2015;283:568-73.

Zhang X, Kimura Y, Fang C, et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* 2007; 110: 228-236.

Zhao L, Ohtaki Y, Yamaguchi K, Matsushita M, Fujita T, Yokochi T, et al. LPS induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood* 2002; 100: 3233–3239.

Zhou HR, Harkema JR, Hotchkiss JA, Yan D, Roth RA, Pestka JJ, Lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) synergistically induce apoptosis in murine lymphoid organs. *Toxicological Sciences.*2000; 53:253-263.

Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 1994;269:17001-17004.

Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm.* 1995;45:13-26.

Zweifach BW, Benacerraf B, Thomas L. The relationship between the vascular manifestations of shock produced by endotoxin, trauma, and hemorrhage. II. The possible role of the reticulo-endothelial system in resistance to each type of shock. *J Exp Med.* 1957;106:403-414.

